

**Tandem-Anordnung des duplizierten
Xanthindehydrogenase-Locus in *Arabidopsis thaliana*:
Analyse der differentiellen Genexpression
und biochemische Charakterisierung
der rekombinanten AtXDH1**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
Dissertation

von Christine Hesberg
aus Hamburg

1. Referent: Prof. Dr. Ralf-R. Mendel
2. Referent: Prof. Dr. W. Bode
eingereicht am: 19.07.2004
mündliche Prüfung am: 26.10.2004
2005

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

Publikation:

Hesberg, C., Hänsch, R., Mendel, R. R. & Bittner, F. Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* **279**, 13547-13554 (2004).

Abkürzungen

A	Adenin	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
A	Ampere	kan	Kanamycin
ABA	Abscisinsäure	kb	Kilobasenpaare
Abb.	Abbildung	KCN	Kaliumcyanid
ALO	Aldehydoreduktase	kDa	Kilodalton
AMP	Adenosinmonophosphat	L, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
amp	Ampicillin	LB	Luria Broth
AO	Aldehydoxidase	M, mM, µM	molar, millimolar, mikromolar
AOX	Alkoholoxidase	Mb	Megabasenpaare
AS	Aminosäure	MeOH	Methanol
BAP	6-Benzylaminopurin	MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
bp	Basenpaare	min	Minute
BSA	Rinder-Serum-Albumin, „bovine serum albumine“	Mo	Molybdän
°C	Grad Celsius	Moco	Molybdäncofaktor
C	Cytosin	MOPS	3-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
C	Kohlenstoff	MPT	Molybdopterin
cDNA	komplementäre DNA	mRNA	„messenger“-RNA
CO ₂	Kohlendioxid	MS	Murashige-Skoog
COD	CO-Dehydrogenase	MTT	3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid	MUG	4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronsäure
C-Term	Carboxyterminus	N	Stickstoff
DCIP	Dichlorphenolindophenol	NAA	α-Naphtylelessigsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat	NAD(P)H	Nicotinamid-Adenindinukleotid (Phosphat) reduziert
dest.	destilliert	NAD ⁺	Nicotinamid-Adenindinukleotid oxidiert
DMSO	Dimethylsulfoxid	NaOCl	Natrium-Hypochlorit
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NH ₃	Ammoniak
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat	Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
DTT	Dithiothreitol	nm	Nanometer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	NO	Stickstoffmonoxid
EST	„expressed sequence tag“	NO ₂ ⁻	Nitrit
EtOH	Ethanol	NR	Nitratreduktase
evtl.	eventuell	N-Term	Aminoternus
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	O ₂	molekularer Sauerstoff
Fe	Eisen	O ₂ ⁻	Superoxid-Anionradikal
G	Guanin	OD	optische Dichte
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm	ONOO ⁻	Peroxinitrit
gent	Gentamycin	PA	Polyacrylamid
GFP	„green fluorescent protein“	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ggf.	gegebenenfalls	PCD	„programmed cell death“
GMP	Guanosinmonophosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
GUS	β-Glucuronidase	PMS	5-Methylphenaziniummethylsulfat
h	Stunde	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	PVP	Polyvinylpyrrolidon
HCl	Salzsäure		
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)		
HR	hypersensitive Reaktion		
IMP	Inosinmonophosphat		

ABKÜRZUNGEN

rif	Rifampicin	V	Volt
RNA	Ribonukleinsäure	v/v	Volumen zu Volumen-Verhältnis
RNAse	Ribonuklease	Vol	Volumen
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies, „reactive oxygen species“	WT	Wildtyp
RT	Raumtemperatur	XDH	Xanthindehydrogenase
RT	Reverse Transkriptase	XO	Xanthinoxidase
S	Schwefel	XOR	Xanthinoxidoreduktase
s	Sekunde	YNB	„yeast nitrogen base“
SDS	Natrium-Dodecylsulfat	A. thaliana-Ökotypen	
SO	Sulfitoxidase	Col-0	Columbia
T	Thymin	Le	Landsberg erecta
Tab.	Tabelle		
TBS	„tris buffered saline“		
TE	Tris-EDTA-Puffer		
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan		
U	Einheit der Enzymaktivität, „unit“		
upm	Umdrehungen pro Minute		

Abkürzungen für Artnamen

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i>
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
<i>C. vicina</i>	<i>Calliphora vicina</i>
<i>D. gigas</i>	<i>Desulfovibrio gigas</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. nidulans</i>	<i>Emmericella nidulans</i>
<i>G. gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
<i>G. max</i>	<i>Glycine max</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>P. sativum</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. capsulatus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>
<i>V. unguiculata</i>	<i>Vigna unguiculata</i>
<i>Z. mays</i>	<i>Zea mays</i>

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS SPURENELEMENT MOLYBDÄN UND DER MOLYBDÄN-COFAKTOR	1
1.1.1	STRUKTUR DES MOLYBDÄN-COFAKTORS	2
1.1.2	SYNTHESE DES MOLYBDÄN-COFAKTORS	3
1.2	DIE MOLYBDO-ENZYME	3
1.2.1	DIE DREI FAMILIEN DER MOLYBDO-ENZYME	4
1.2.2	PFLANZLICHE MOLYBDO-ENZYME	5
1.3	XANTHINDEHYDROGENASE UND XANTHINOXIDASE	6
1.3.1	BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER XANTHINOXIDOREDUKTASE	7
1.3.2	XANTHINDEHYDROGENASE IN PFLANZEN	11
2	ERGEBNISSE	13
2.1	ISOLATION UND CHARAKTERISIERUNG DER XDH-GENE IN <i>A. THALIANA</i>	13
2.1.1	KLONIERUNG DER <i>AtXDH1</i> cDNA	13
2.1.2	KLONIERUNG DER <i>AtXDH2</i> cDNA MITTELS RT-PCR	13
2.1.3	PHYLOGENETISCHE ANALYSE	15
2.2	REGULATION UND EXPRESSION VON <i>AtXDH1</i> UND <i>AtXDH2</i>	17
2.2.1	UNTERSUCHUNG VON TRANSKRIPTION UND ENZYMAKTIVITÄTEN	17
2.2.2	EINFLUSS ABIOTISCHER STRESSE	19
2.2.3	ANALYSE DER PUTATIVEN PROMOTOR-REGIONEN	20
2.3	ANALYSE VON <i>A. THALIANA</i> XDH T-DNA INSERTIONS-MUTANTEN	22
2.3.1	MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG	23
2.3.2	PHYSIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG	24
2.4	SUBZELLULÄRE LOKALISIERUNG DER <i>AtXDH1</i>	25
2.4.1	GFP- <i>AtXDH1</i> FUSIONSPROTEINE	26
2.4.2	PEROXISOMENISOLATION	27
2.5	HETEROLOGE EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DER <i>AtXDH1</i>	27
2.5.1	KLONIERUNG UND EXPRESSION DER <i>AtXDH1</i> IN <i>E. COLI</i>	27
2.5.2	EXPRESSION IN PFLANZLICHEN SYSTEMEN	28
2.5.3	KLONIERUNG UND TRANSFORMATION IN <i>P. PASTORIS</i>	30
2.5.4	EXPRESSION DER <i>AtXDH1</i> IN <i>P. PASTORIS</i> IN SCHÜTTELKOLBEN	30
2.5.5	FERMENTATION VON <i>P. PASTORIS</i>	31
2.5.6	AUFREINIGUNG DER <i>AtXDH1</i> AUS <i>P. PASTORIS</i>	36
2.6	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER <i>AtXDH1</i>	39

2.6.1	ANALYSE DER PROTEINSEQUENZ	39
2.6.2	GRÖßENBESTIMMUNG MITTELS GELFILTRATION	42
2.6.3	ABSORPTIONSSPEKTRUM DER ATXDH1	42
2.6.4	BASALE AKTIVITÄTSUNTERSUCHUNGEN	43
2.6.5	AKTIVIERUNG DURCH DIE MOCO-SULFURASE ABA3	45
2.6.6	INHIBITOREN UND SUBSTRATSPEZIFITÄT DER ATXDH1	45
2.6.7	UNTERSUCHUNG DER NO-PRODUKTION	47
2.6.8	ELEKTRONENAKZEPTOREN UND SUPEROXIDRADIKAL-BILDUNG	48
3	DISKUSSION	49
3.1	DIE PFLANZLICHEN XANTHINDEHYDROGENASEN ATXDH1 UND ATXDH2 IN <i>A. THALIANA</i>	49
3.1.1	DIE MUTMAßLICHE DUPLIKATION DES XDH-LOCUS IN <i>A. THALIANA</i>	49
3.1.2	<i>ATXDH1</i> UND <i>ATXDH2</i> WERDEN DURCH VERSCHIEDENE PROMOTOREN REGULIERT	51
3.2	REKOMBINANTE ÜBEREXPRESSION DER ATXDH1 IM EUKARYOTISCHEN SYSTEM <i>P. PASTORIS</i>	51
3.3	DIE BIOCHEMISCHEN EIGENSCHAFTEN DES ATXDH1-PROTEINS	53
3.3.1	ATXDH1 REPRÄSENTIERT EINE XANTHINOXIDOREDUKTASE	53
3.3.2	ATXDH1 LIEGT AUSSCHLIEßLICH IN DER DEHYDROGENASE-FORM VOR	56
3.3.3	BILDUNG VON SUPEROXIDRADIKALEN DURCH DIE ATXDH1	58
3.4	DIE REGULATION DER XDH UND IHRE BEDEUTUNG <i>IN VIVO</i>	59
3.4.1	DER PURIN-KATABOLISMUS IN PFLANZEN	59
3.4.2	DIE PFLANZLICHE XDH ERFÜLLT WEITERE FUNKTIONEN	60
3.4.3	DIE ATXDH1 WIRD DURCH DIVERSE STRESSE REGULIERT	62
3.4.4	DIE PUTATIVEN XDH-PROMOTOREN ENTHALTEN STRESS-ABHÄNGIGE REGULATIONS- ELEMENTE	63
3.4.5	ATXDH1 IM ZUSAMMENHANG MIT SENESZENZ UND REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES	64
3.4.6	AUSBLICK	66
4	MATERIAL UND METHODEN	67
4.1	MATERIAL	67
4.1.1	VERWENDETE MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	67
4.1.2	VERWENDETE CHEMIKALIEN UND ENZYME	67
4.1.3	BAKTERIEN- UND HEFE-STÄMME	67
4.1.4	VERWENDETE PLASMIDE	68
4.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	68
4.2.1	KLONIERUNGSTECHNIKEN	68

4.2.2	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)	69
4.2.3	DNA-SEQUENZIERUNG	70
4.2.4	GESAMT-DNA-ISOLATION AUS <i>A. THALIANA</i>	70
4.2.5	GESAMT-RNA ISOLATION AUS <i>A. THALIANA</i>	71
4.3	PROTEINBIOCHEMISCHE ARBEITEN	71
4.3.1	AUFREINIGUNG VON HIS-TAG PROTEINEN	71
4.3.2	ANIONENTAUSSCHER-CHROMATOGRAPHIE	72
4.3.3	GELFILTRATION	72
4.3.4	KONZENTRIERUNG VON PROTEINLÖSUNGEN	72
4.3.5	BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN	73
4.3.6	SDS-POLYACRYLAMID-GEL-ELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	73
4.3.7	IMMUNBLOT-ANALYSE	73
4.3.8	EXPRESSION VON ABA3 IN <i>E. COLI</i>	74
4.4	NACHWEIS VON ENZYMAKTIVITÄTEN	74
4.4.1	FLUORIMETRISCHER B-GLUCURONIDASE (GUS) AKTIVITÄTSTEST	74
4.4.2	IN GEL-AKTIVITÄTSNACHWEISE (NACH MENDEL U. MÜLLER, 1976)	74
4.4.3	SPEKTROPHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER XDH-AKTIVITÄT	75
4.4.4	NACHWEIS VON SUPEROXID-RADIKAL-BILDUNG	75
4.4.5	BESTIMMUNG VON STICKSTOFFMONOXID	76
4.4.6	IN VITRO-SULFURIERUNG DER XDH DURCH ABA3	76
4.5	KULTUR VON <i>A. THALIANA</i>	76
4.5.1	PFLANZENANZUCHT	76
4.5.2	STERILISATION VON <i>A. THALIANA</i> -SAMEN	77
4.6	ERZEUGUNG TRANSGENER PFLANZEN	77
4.6.1	VORBEREITUNG VON <i>A. TUMEFACIENS</i> FÜR INDIREKTEN GENTRANSFER	77
4.6.2	VAKUUMINFILTRATION VON <i>A. THALIANA</i>	77
4.6.3	BLATTSCHIEBENTRANSFORMATION VON <i>N. TABACUM</i>	79
4.6.4	DIREKTER GENTRANSFER MITTELS PARTIKELKANONE	79
4.7	ARBEITEN MIT <i>P. PASTORIS</i>	81
4.7.1	TRANSFORMATION VON <i>P. PASTORIS</i>	81
4.7.2	EXPRESSION IM SCHÜTTELKOLBEN	81
4.7.3	BESTIMMUNG VON WACHSTUMSPARAMETERN	82
4.7.4	FERMENTATION VON <i>P. PASTORIS</i>	82
4.7.5	PROTEINEXTRAKTION AUS <i>P. PASTORIS</i>	84
4.7.6	EXPRESSION DER AAO1 IN <i>P. PASTORIS</i>	84
4.8	PEROXISOMENISOLATION	84
5	LITERATURVERZEICHNIS	87

6	ANHANG	97
6.1	PRIMER	97
6.2	SEQUENZEN	98
6.2.1	SEQUENZ DER <i>AtXDH1</i> -CDNA (GENBANK ACCESSION: AY171562)	98
6.2.2	SEQUENZ DER <i>AtXDH2</i> -CDNA (GENBANK ACCESSION: AY518202)	101
6.2.3	INTEGRATIONSORT DER T-DNA IN DER <i>AtXDH1</i> -„KNOCK OUT“-MUTANTE	105
6.2.4	INTEGRATIONSORT DER T-DNA IN DER <i>AtXDH2</i> -„KNOCK OUT“-MUTANTE	105
	ZUSAMMENFASSUNG	107

1 Einleitung

Die Xanthindehydrogenase (XDH) ist ein im gesamten Organismenreich weit verbreitetes Enzym, das in Säugetieren bereits seit vielen Jahren untersucht wird und dementsprechend gut charakterisiert ist. Die pflanzliche XDH dagegen ist erst seit vergleichsweise kurzer Zeit bekannt und lässt Spielraum für eine Anzahl verschiedener Untersuchungen, die Gegenstand dieser Arbeit sind.

Die XDH-Proteine werden den so genannten Molybdo-Enzymen zugeordnet, denen ein relativ seltener Cofaktor gemeinsam ist. Dieser Cofaktor enthält ein Molybdän (Mo)-Atom und ist ein charakteristisches Merkmal der entsprechenden Enzyme. Aus diesem Grund soll zunächst die Klasse der Molybdo-Enzyme, beginnend mit dem Molybdän-Cofaktor, näher erläutert werden, bevor auf die Eigenheiten der XDH eingegangen wird.

1.1 Das Spurenelement Molybdän und der Molybdän-Cofaktor

Das Spurenelement Mo, ein Übergangsmetall aus der 6. Nebengruppe des Periodensystems, hat eine essentielle Bedeutung in allen biologischen Systemen. Bereits Anfang des letzten Jahrhunderts war seine Relevanz für das Wachstum von Pflanzen und Mikroorganismen bekannt (zusammengefasst durch Coughlan, 1980), jedoch wurden Mo-Mangelsymptome bei Feldpflanzen erstmals vor ca. 50 Jahren beschrieben (zusammengefasst durch Gupta, 1997).

Die Bedeutung des Mo für Menschen und Tiere wurde ebenfalls in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts gezeigt. Der Nachweis der Bindung von Mo an die Xanthinoxidase (XO) in Rattenlebern (Reichert u. Westerfeld, 1953) galt gleichzeitig als erster Hinweis auf eine Enzymassoziiierung des Mo. Bei der Untersuchung von Nitratreduktase (NR)-Mutanten des filamentösen Pilzes *Emmericella nidulans* (früher *Aspergillus nidulans*) fanden Cove und Pateman (1963) einen gleichzeitigen Ausfall der XDH in einigen dieser Mutanten. Da die Mo-Abhängigkeit die einzige Gemeinsamkeit beider Enzyme war, führte diese Entdeckung zur Postulierung eines gemeinsamen Molybdän-haltigen Cofaktors, dessen Synthese in den entsprechenden NR/XDH⁻ Mutanten defizient war (Pateman, 1964).

Erste Hinweise darauf, dass der Molybdän-Cofaktor (Moco) eine konservierte Funktion aufweist und ubiquitär verbreitet ist, lieferten Experimente mit der *Neurospora crassa nit-1* Mutante. Nason und Mitarbeiter zeigten 1971, dass tierische, pflanzliche und bakterielle Moco-haltige Extrakte in der Lage waren, das inaktive NR-Apoenzym dieser Mutante zu funktioneller NR zu komplementieren. Als einziges der Mo-abhängigen Enzyme konnte die Nitrogenase die *nit-1* Mutante nicht komplementieren. Dies ist in ihrem bisher einzigartigen Fe-Moco

begründet, in dem das Mo über Homocitrat komplexiert wird (Shah u. Brill, 1977), und der nicht mit dem Moco anderer Molybdo-Enzyme vergleichbar ist.

1.1.1 Struktur des Molybdän-Cofaktors

Auf Grund der Sauerstoffempfindlichkeit und der daraus bedingten Instabilität des Moco wurde ein Großteil der Strukturanalyse an seinen Degradations- und Oxidationsprodukten durchgeführt. Als organische Grundkomponente des Moco konnte ein Pterin identifiziert werden (Johnson *et al.*, 1980); wenig später wurde eine aus vier C-Atomen und einem terminalen Phosphatester bestehende Seitenkette am C-6 des Pterins entdeckt (Johnson *et al.*, 1984). Die Existenz von Schwefel in Form einer Dithiolengruppe am C-1 und C-2 der Seitenkette wurde durch eine Behandlung mit Iodacetamid nachgewiesen (Kramer *et al.*, 1987).

Das erste Struktur-Modell des aktiven Moco wurde 1987 von Kramer und Mitarbeitern erstellt, die die Assemblierung des Mo-Atoms über die Dithiolengruppe an das Tetrahydropterin-Gerüst vorschlugen. Die im Rahmen dieses Modells aufgestellte Bezeichnung Molybdopterin (MPT) für die Mo-freie, inaktive Form im Gegensatz zum Mo-enhaltenden, aktiven Moco wurde bis heute beibehalten. Erst durch die Kristallisierung der Aldehydoxidoreduktase (ALO) aus *Desulfovibrio gigas* wurde 1995 die tatsächliche Moco-Struktur gelöst (Romão *et al.*, 1995), die im Unterschied zum bisher postulierten Modell einen Pyranoring zwischen dem C-3 der Seitenkette und dem C-7 des Pterins enthält. Dadurch entsteht statt der bisher angenommenen bizyklischen eine trizyklische Struktur (Abb. 1-1). Die Strukturaufklärung weiterer bakterieller Molybdo-Enzyme bestätigte das Vorliegen des Moco als 5,6,7,8-Tetrahydropyranopterin (Schindelin *et al.*, 1996; Boyington *et al.*, 1997). Diese Struktur wurde als unter allen Organismen konserviert vorgeschlagen. Am eubakteriellen Moco ist zwar zusätzlich ein Nukleotid am C-4 der Seitenkette assoziiert (Johnson *et al.*, 1990), dennoch kann weiterhin von einer universellen Grundstruktur des Moco ausgegangen werden.

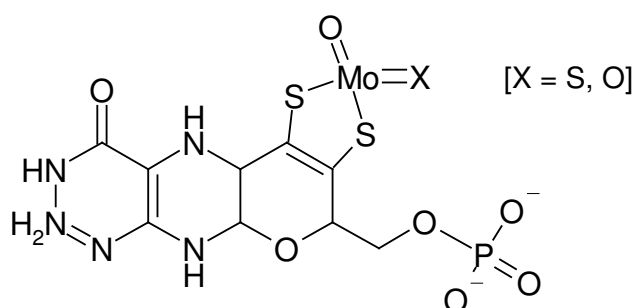


Abb. 1-1: Strukturformel des eukaryotischen Molybdän-Cofaktors.

Dargestellt ist die durch Kristallisierung bestätigte Struktur des aktiven 5,6,7,8-Tetrahydropyranopterin.

1.1.2 Synthese des Molybdän-Cofaktors

Parallel zur Strukturaufklärung des Moco erfolgte die Untersuchung seiner Synthese anhand von pleiotropen Molybdo-Enzym Mutanten von *Escherichia coli*. Das derzeit gültige Modell der Biosynthese des Moco in *E. coli* (zusammengefasst durch Rajagopalan, 1996) lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: Zunächst wird ein phosphoryliertes Guanosin-Derivat durch eine Ringerweiterung zu einer Schwefel-freien Pterinverbindung, dem „Precursor Z“ umgesetzt. Die MPT-Synthase katalysiert im zweiten Schritt das Anhängen der Dithiolengruppierung sowie die Dezyklisierung der Phosphatgruppe, so dass MPT entsteht (Pitterle u. Rajagopalan, 1993; Pitterle *et al.*, 1993). Im letzten Schritt wird das Mo an die Dithiolengruppe des MPT-Gerüsts komplexiert, bevor die für Eubakterien spezifische Anheftung eines Nukleotids erfolgt und so die aktive Dinukleotid-Form des Cofaktors entsteht.

Aufgrund der konservierten Struktur und der universellen Funktion des Moco wurde angenommen, dass auch die Synthese des Moco in allen Organismen zumindest ähnlich abläuft (Mendel, 1992). Die über funktionelle Komplementation von *E. coli*-Mutanten isolierten ersten pflanzlichen Moco-Synthesegene aus *Arabidopsis thaliana* (Hoff *et al.*, 1995; Stallmeyer *et al.*, 1995) bestätigten diese Hypothese. Im aktuellen Modell der Moco-Biosynthese in Eukaryoten (Mendel u. Schwarz, 2002) sind mittlerweile für die Mehrzahl der charakterisierten bakteriellen Moco-Biosynthese-Proteine die entsprechenden homologen und funktionell charakterisierten eukaryotischen Proteine aus *A. thaliana* und *Homo sapiens* beschrieben.

1.2 Die Molybdo-Enzyme

Es sind über 40 Mo-enthaltende Enzyme bekannt, die vorwiegend in Bakterien zu finden sind und grundlegende Reaktionen des Stickstoff-, Schwefel- und Sauerstoffmetabolismus katalysieren (Hille, 1996). Bis auf die bereits erwähnte Nitrogenase inkorporieren alle Enzyme das Mo an MPT gebunden als Moco. Diese so genannten mononuklearen Molybdo-Enzyme katalysieren den Transfer eines Sauerstoff-Atoms zum bzw. vom Substrat in einer zwei-Elektronen übertragenden Redoxreaktion (Hille, 1996). Während der Reaktion befindet sich das Mo im Enzym in einem Kreislauf zwischen dem oxidierten Mo^{VI} - und dem reduzierten Mo^{IV} -Zustand. Der gesamte Reaktionsmechanismus besteht somit aus der Kopplung einer oxidativen und einer reduktiven Halbreaktion und ist gekennzeichnet durch die Reduktion des Mo^{VI} bzw. die Oxidation des Mo^{IV} . Aufgrund der zwei Elektronen übertragenden Redox-Reaktion zum oder vom Substrat vollzieht sich am Mo in der entsprechenden Halbreaktion ein direkter zwei-Elektronen Wechsel (Bray, 1988). In der jeweils komplementären Halbreaktion erfordert die Rückkehr in den Grundzustand des Enzyms die Aufnahme bzw. Abgabe von Elektronen am Mo. Dies geschieht über einen internen Elektronentransport zwischen dem Mo und einem zweiten Reaktionszentrum. Da es sich bei diesem zweiten Reaktions-

zentrum typischerweise um eine Einzelelektronen übertragende Redox-Gruppe wie z.B. ein Häm oder [Fe-S]-Zentrum handelt, erfolgt die Rückkehr in den Ausgangszustand in der Regel über Mo^{V} als Zwischenstufe.

1.2.1 Die drei Familien der Molybdo-Enzyme

Die meisten der mononuklearen Molybdo-Enzyme lassen sich einer von drei Familien zuordnen (Hille, 1996):

- (1) Die Mitglieder der Xanthinoxidase-Familie katalysieren die oxidative Hydroxylierung von Aldehyden und heterozyklischen Aromaten, die notwendigerweise mit der Spaltung einer C-H Bindung einhergeht. Diese Enzyme werden auch als Hydroxylasen bezeichnet, da die dem Substrat angefügte Hydroxylgruppe aus einem Wassermolekül stammt (Bray, 1975). Typische Vertreter dieser Klasse sind neben den eukaryotischen Xanthinoxidoreduktasen (XOR) und Aldehydoxidasen (AO) eine Vielzahl prokaryotischer Enzyme, wie die ALO aus *D. gigas* und die Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Pyrococcus furiosus*.
- (2) Ausschließlich eukaryotische Enzyme enthält die Sulfitoxidase-Familie, in der neben der namensgebenden Sulfitoxidase (SO) die assimilatorischen NRs aus Algen, Pilzen und höheren Pflanzen zusammengefasst werden. Diese Dehydroxylasen enthalten einen Dioxo-Moco, d.h. am Mo sind zwei terminale Sauerstoff-Atome ligandiert. Die Mitglieder dieser Familie katalysieren die Übertragung eines Sauerstoff-Atoms zu bzw. von einem Elektronenpaar eines Schwefel- oder Stickstoffatoms am Substrat.
- (3) Die Vertreter der DMSO-Reduktase-Familie sind dagegen ausschließlich in Eubakterien zu finden und enthalten ein Guanosin-Nukleotid als organische Komponente des Moco. Neben der DMSO-Reduktase und der Biotin-Sulfoxid-Reduktase finden sich hier unter anderem die dissimilatorischen NRs und die Formiat-Dehydrogenasen. Diese Enzyme fungieren in Abwesenheit von Sauerstoff bei Vorhandensein ihres entsprechenden Substrates als terminale Reduktasen und sorgen für einen effizienten Energiestoffwechsel des jeweiligen Eubakteriums. Als Besonderheit gelten die DMSO-Reduktasen aus *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides*, die keine weiteren Redox-Zentren außer dem Moco enthalten. Dies macht den Moco zugänglich für spektroskopische und kinetische Untersuchungen, da sein Absorptionsspektrum nicht durch die stärkere Absorption der üblichen prosthetischen Gruppen wie [Fe-S]-Zentren oder Flavine überlagert wird (Bastian *et al.*, 1991; Kilpatrick *et al.*, 1995).

1.2.2 Pflanzliche Molybdo-Enzyme

Von den über 40 existierenden Molybdo-Enzymen sind lediglich AO, die XDH, die NR sowie die SO in Pflanzen zu finden. Diese vier Enzyme sind jeweils aus zwei identischen Untereinheiten zusammengesetzt und nur als Dimer aktiv. Wie in Abb. 1-2 dargestellt ist, sind die Monomere von NR, AO und XDH in mehrere Domänen unterteilt, an die außer dem Moco die weiteren prosthetische Gruppen der internen Elektronentransport-Kette binden.

Die SO dagegen besteht nur aus der Moco-Domäne und ist damit das einzige eukaryotische Molybdo-Enzym, das kein zweites Redox-Zentrum besitzt. Im Gegensatz zur tierischen SO, die die bei der Oxidation von Sulfit zu Sulfat freiwerdenden Elektronen auf Cytochrom c überträgt, nutzt die pflanzliche SO molekularen Sauerstoff (O_2) als Elektronenakzeptor (R. Hänsch, unveröffentlichte Daten). Erst im Jahr 2001 wurde die Existenz der SO in Pflanzen nachgewiesen und die SO aus *A. thaliana* als ein peroxisomales Protein mit einer Masse von 90 kDa für das native Homodimer identifiziert (Eilers *et al.*, 2001). Die NR ist das Schlüsselenzym der anorganischen Stickstoff (N)-Assimilation und katalysiert die Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Das Monomer von 100 kDa besteht aus drei Domänen, die durch Protease-sensitive „Hinge“-Regionen miteinander verbunden sind (Abb. 1-2). Die drei Domänen bilden durch die gebundenen prosthetischen Gruppen drei Redox-Zentren, die den Elektronentransfer von NAD(P)H über FAD, Häm und Moco auf Nitrat katalysieren (zusammengefasst durch Campbell, 1999).

Während NR und SO wie erwähnt zu den Dioxo-Molybdo-Enzymen gehören, sind AO und XDH Vertreter der Monooxo-Hydroxylasen. Am Molybdän im aktiven Zentrum dieser Enzyme sind eine terminale Oxo-Gruppe und ein terminaler Schwefel ligandiert, der weder den jeweiligen Apo-Proteinen noch dem Pterin-Gerüst des Moco entstammt, sondern anorganischer Natur ist (Wahl u. Rajagopalan, 1982; Wahl *et al.*, 1982). Eine *in vitro* Cyanid-Behandlung des Enzyms führt zu dessen Inaktivierung, da der Schwefel in Form von Thiocyanat abgespalten und durch einen weiteren Oxo-Liganden ersetzt wird (Massey u. Edmondson, 1970). Diese Desulfo-Form des Enzyms lässt sich durch die Behandlung mit Sulfid und Dithionit jedoch wieder in die aktive Form überführen. *In vivo* wird der terminale Schwefel-Ligand durch eine spezifische enzymatische Reaktion an den Moco angefügt. Diese finale Aktivierung der Monooxo-Hydroxylasen erfolgt in *A. thaliana* durch die Moco-Sulfurase ABA3, deren Fähigkeit zur Sulfurierung des an das Enzym gebundenen Moco *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Bittner *et al.* 2001).

Mit 29-31% Identität auf Aminosäure (AS)-Ebene sind die pflanzlichen Monooxo-Hydroxylasen AO und XDH signifikant homolog zueinander. Daraus und aus ihrer strukturellen Ähnlichkeit kann geschlossen werden, dass sie sich aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelten (Rodríguez-Trelles *et al.*, 2003). Beide Enzyme besitzen eine molekulare Masse von

ca. 300 kDa und enthalten [Fe-S]-Zentren, FAD und Moco als prosthetische Gruppen. Die Moco-Bindungsdomäne befindet sich am C-Terminus des AO- und XDH-Monomers, während sie bei der Nitratreduktase genau entgegengesetzt am N-Terminus angeordnet ist (Abb. 1-2). In *A. thaliana* existieren die vier für AO-Proteine kodierenden Gene *AAO1-AAO4*, die sich auf verschiedenen Chromosomen befinden und damit nicht allel sind (Sekimoto *et al.*, 1998). Nach der Auftrennung von *A. thaliana*-Rohextrakten im nativen PA-Gel wurden mittels Aktivitätsfärbung die drei Isoformen AO α , AO β und AO γ detektiert, die die Oxidation verschiedener Aldehyde wie Indol-3-carbaldehyd, 1-Naphthaldehyd und Benzaldehyd katalysieren (Seo *et al.*, 1998). Diese drei Isoformen werden von den Genen *AAO1* und *AAO2* codiert, wobei AO α und AO β Homodimere aus *AAO1* und *AAO2* sind, während AO γ ein Heterodimer aus den Produkten beider Gene darstellt. Seo und Mitarbeiter (2000) identifizierten mit der AO δ eine weitere homodimere AO-Isoform, die vom *AAO3*-Gen codiert wird und mit der Umsetzung von Abscisinaldehyd zu Abscisinsäure (ABA) den finalen Schritt der stressabhängigen ABA-Biosynthese katalysiert. Ein weiteres Heterodimer aus *AAO2* und *AAO3* ist ebenfalls bekannt, jedoch nicht näher beschrieben (Koiwai *et al.*, 2004). Das *AAO4*-Gen wird hauptsächlich in Schoten exprimiert, seine genaue Funktion ist allerdings noch unbekannt (Seo *et al.*, 2000).

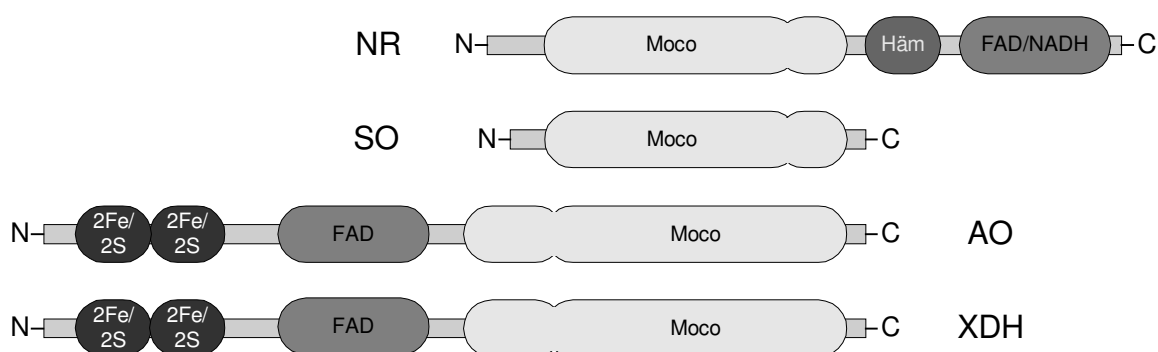


Abb. 1-2: Domänenstruktur der Molybdo-Enzyme in *A. thaliana*.

Die einzelnen Domänen sind mit den Namen der gebundenen prosthetischen Gruppen gekennzeichnet und durch so genannte „Hinge“-Regionen miteinander verbunden (NR = Nitratreduktase; SO = Sulfitoxidase; AO = Aldehydoxidase; XDH = Xanthindehydrogenase).

1.3 Xanthindehydrogenase und Xanthinoxidase

Die XDH (EC 1.1.1.204) und die XO (EC 1.1.3.22) repräsentieren verschiedene Formen desselben Genproduktes. Beide Enzymformen und ihre Reaktionen werden oft als Xanthinoxidoreduktase (XOR) zusammengefasst und sollen auch im Folgenden so bezeichnet werden.

Die Rinder-XOR kommt in großen Mengen in der Milch vor, wo sie eine Hauptkomponente der Membran der Fett-Globuli (MFGM = *milk fat globule membrane*) darstellt (Bray, 1975; Patton u. Keenan, 1975). Wohl aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit aus Kuhmilch wurde die XOR vor über 100 Jahren entdeckt und seit den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts aus Kuhmilch aufgereinigt und erforscht (Massey u. Harris, 1997). Die Rinder-XOR ist damit nicht nur seit langem bekannt, sondern auch eines der am besten untersuchten Enzyme überhaupt. Sie ist ein Schlüsselenzym des Purin-Katabolismus und katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure. In Säugetieren ist die Hauptaktivität der XOR im Gewebe von Leber und Darm zu finden, sie ist jedoch in manchen Säugerarten auch im Blut und im Herzen vorhanden (De Jong *et al.*, 1990). Beim Menschen sind außer in Leber und Darm lediglich sehr geringe XOR-Aktivitäten in weiteren Geweben zu finden (Saksela *et al.*, 1998). Eine XOR-Defizienz im Menschen wird als Xanthinurie bezeichnet und ist als asymptomatisch bekannt (Simmonds *et al.*, 1995). Hypoxanthin und Xanthin sind besser wasserlöslich als Harnsäure und werden in großen Mengen im Urin ausgeschieden, so dass es daher nicht zu klinischen Symptomen kommt. Eine Überfunktion der XOR führt dagegen zu einer erhöhten Harnsäurekonzentration im Serum, der so genannten Hyperurikämie. In den meisten Fällen ist Hyperurikämie jedoch auf eine vermehrte Zufuhr von Nahrungsproteinen oder eine verminderte renale Harnsäureausscheidung zurückzuführen (Thefeld u. Dortsch, 1995). Als Gicht wird die klinisch manifeste Hyperurikämie bezeichnet, die durch Ausscheidung von Salzen der Harnsäure an verschiedenen Körperstellen, vorwiegend in den Gelenken und deren Umgebung, charakterisiert ist. Zur Behandlung der Gicht-Symptome wird Allopurinol eingesetzt, das die XOR inaktiviert und damit die Geschwindigkeit der Harnsäureproduktion senkt.

Die XOR scheint ubiquitär im Organismenreich verbreitet zu sein, da XOR-Aktivität in Extrakten aller bisher untersuchten Spezies einschließlich Bakterien, Pilzen, Algen und höheren Pflanzen gefunden wurde (Parks u. Granger, 1986). Bisher wurden die Nukleotid- und Protein-Sequenzen der XOR von Mensch (*H. sapiens*) (Wright *et al.*, 1993), Rind (*Bos taurus*) (Berglund *et al.*, 1996), Ratte (*Rattus norvegicus*) (Amaya *et al.*, 1990), Maus (*Mus musculus*) (Terao *et al.*, 1992), Huhn (*Gallus gallus*) (Sato *et al.*, 1995), *Drosophila melanogaster* (Keith *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1987), Seidenraupe (*Bombyx mori*) (Kômoto *et al.*, 1999), *Caliphora vicina* (Rocher-Chambonnet *et al.*, 1987), *Caenorhabditis elegans* (Wilson *et al.*, 1994), dem Pilz *E. nidulans* (Glatigny u. Scazzocchio, 1995) und den Bakterien *R. capsulatus* und *E. coli* (Leimkühler *et al.*, 1998; Xi *et al.*, 2000) veröffentlicht.

1.3.1 Biochemische Eigenschaften der Xanthinoxidoreduktase

Neben dem aus Milch aufgereinigten Rinder-Enzym wurde die XOR aus den Lebern von *R. norvegicus* (Waud u. Rajagopalan, 1976; Ikegami u. Nishino, 1986), *G. gallus* (Rajagopa-

Ian u. Handler, 1967; Nishino u. Nishino, 1989) und Pute (*Meleagris gallopavo*) (Cleere u. Coughlan, 1975) sowie aus den Brustdrüsen von *M. musculus* (McManaman *et al.*, 1999) aufgereinigt. Obwohl diese Präparationen weniger gut charakterisiert sind als die aus Kuhmilch, sind ihre grundlegenden Eigenschaften denen des Rinder-Enzyms generell ähnlich. Wie schon erwähnt, ist die XOR der namensgebende Vertreter der Xanthinoxidase-Familie und gehört damit zur Klasse der Monooxo-Molybdo-Hydroxylasen. Alle bisher bekannten eukaryotischen XOR-Proteine sind α_2 Homodimere, in denen die Redox-aktiven Cofaktoren in distinkten Domänen innerhalb einer einzelnen Polypeptid-Kette zu finden sind. Jede Untereinheit ist demzufolge in drei Domänen unterteilt: am N-Terminus binden zwei [2Fe-2S]-Zentren in einer Domäne von 20 kDa, die anschließende 40 kDa-Domäne beherbergt die FAD-Bindungsstelle, und die C-terminale Domäne von 85 kDa enthält die Moco-Bindungsstelle.

Das Enzym der Säugetiere existiert in zwei ineinander umwandelbaren Formen, der XDH und der XO. *In vivo* dominiert die Dehydrogenase-Form, die entweder reversibel durch die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen oder irreversibel mittels Proteolyse in die Oxidase-Form überführt werden kann (Della Corte u. Stirpe, 1972). Abbildung 1-3 zeigt ein Modell beider Vorgänge. Limitierte Proteolyse konvertiert die Säuger-XDH in die Oxidase-Form durch Spaltung innerhalb beider „Hinge“-Regionen des Enzyms, wodurch drei den Domänen entsprechende Fragmente von 20 kDa, 40 kDa und 85 kDa entstehen (Abb. 1-3 *rechts*). Diese Fragmente liegen jedoch nur unter denaturierenden Bedingungen dissoziiert vor, so dass von einer engen Verbindung der Fragmente untereinander ausgegangen werden kann

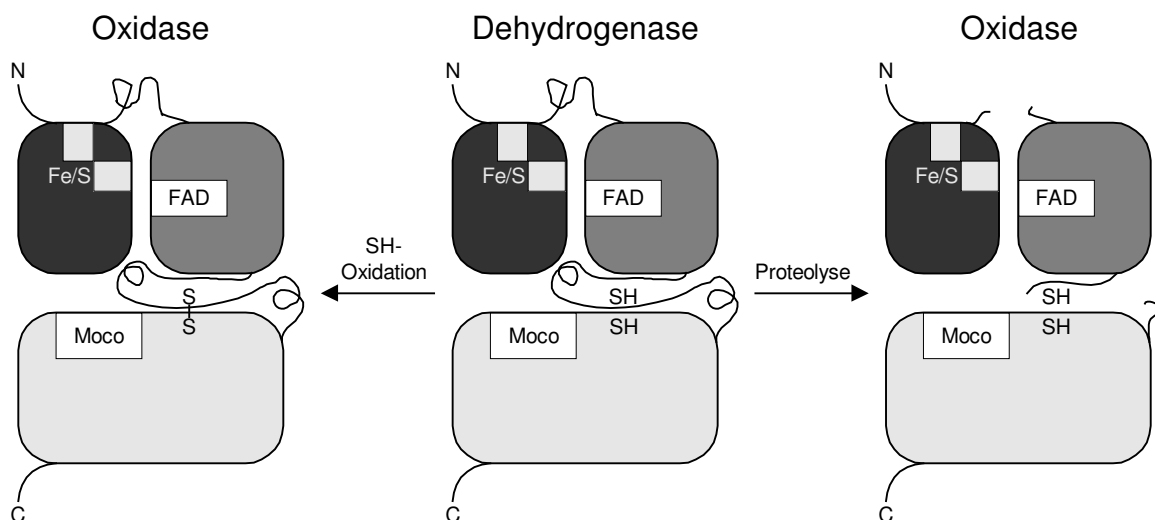


Abb. 1-3: Schematisches Modell von Dehydrogenase- und Oxidase-Formen der Säuger-XOR.

Die Xanthindehydrogenase (*Mitte*) wird reversibel durch Oxidation von Cystein-Resten (*links*) bzw. irreversibel durch partielle Proteolyse (*rechts*) in die jeweilige Xanthinoxidase-Form konvertiert. Zwecks besserer Übersichtlichkeit ist nur eine Untereinheit der homodimeren Enzyme abgebildet.

(Amaya *et al.*, 1990). Bei der reversiblen Konversion von XDH in XO kommt es durch Zugabe eines Sulfhydryl-Oxidationsmittels zur Reduktion mehrerer Cystein-Reste im Enzym, von denen die Mehrzahl jedoch nicht direkt an der Umwandlung beteiligt ist (Waud u. Rajagopalan, 1976; Hunt u. Massey, 1992). Stattdessen bilden lediglich zwei Cystein-Reste eine Disulfid-Brücke innerhalb des Enzyms aus (Nishino u. Nishino, 1997; Rasmussen *et al.*, 2000) und verursachen dadurch die reversible Konversion der XDH in die Oxidase-Form (Abb. 1-3 *links*). Im Gegensatz zur XDH in Säugern kann das Enzym aus Hühnchen weder durch Proteolyse noch durch Modifikation von SH-Gruppen in die Oxidase-Form überführt werden. Begrenzte Proteolyse führt zwar auch in diesem Fall zu einer Spaltung des Enzyms in die drei Domänen, geht jedoch mit einem Rückgang der Aktivität einher (Sato *et al.*, 1995).

Die XDH und die XO katalysieren beide die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure (Abb. 1-4). Die reduktive Halbreaktion des Enzyms findet am Mo-Zentrum statt, wobei das Metall von Mo^{VI} zu Mo^{IV} reduziert wird. Die Reoxidation des Mo-Zentrums erfolgt mittels internen Elektronentransfers zwischen den [Fe-S]-Zentren und dem FAD. Der Unterschied zwischen der XDH und der XO liegt in der Substratspezifität in der oxidativen Halbreaktion. Die Dehydrogenase reduziert hauptsächlich NAD^+ in einer direkten 2-Elektronen-Übertragung, vermag jedoch auch O_2 als Elektronenakzeptor zu nutzen. Die Oxidase dagegen reduziert ausschließlich O_2 und ist nicht in der Lage, NAD^+ umzusetzen. Sowohl die XDH als auch die XO erzeugen bei der Reduktion von O_2 außer Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auch Superoxidradikale ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Hille u. Nishino, 1995). Diese Fähigkeit der XOR zur Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS = „reactive oxygen species“) ist im Zusammenhang mit klinischen Studien bezüglich Ischämie/Reperfusion von besonderem

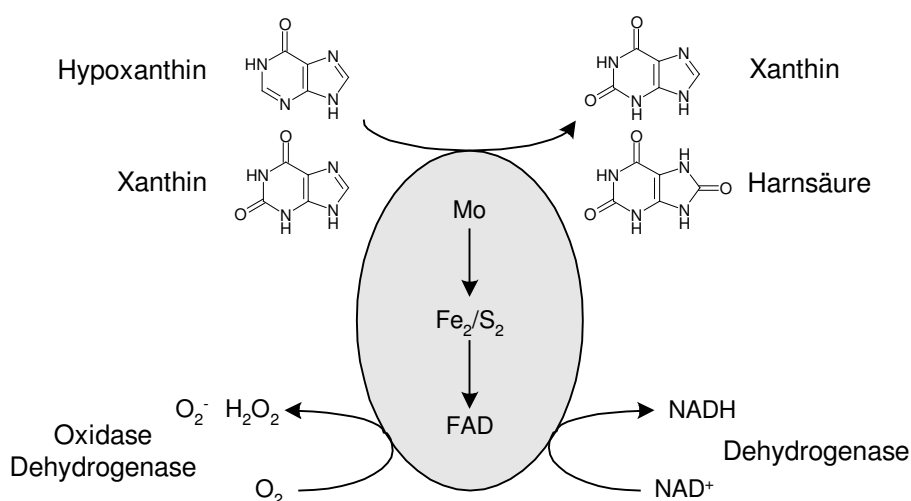


Abb. 1-4: Von der XOR katalysierte Hauptreaktionen.

Die Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin erfolgt am Mo-Redoxzentrum, während die Reduktion von NAD^+ (durch die Dehydrogenase) bzw. O_2 (hauptsächlich durch die Oxidase) am FAD erfolgt.

Interesse. Die Durchblutungsstörung eines Gewebes infolge unzureichender oder fehlender arterieller Blutzufuhr wird als Ischämie bezeichnet. Bei der Wiederdurchblutung (Reperfusion) ischämischer Gewebe kommt es infolge der Sauerstoffzufuhr zu einer verstärkten Freisetzung von ROS, an deren Bildung die XOR beteiligt ist (McCord, 1985).

Zusätzlich zu Hypoxanthin und Xanthin katalysiert die XOR die Hydroxylierung von verschiedenen N-Heterozyklen und Aldehyden (Krenitsky *et al.*, 1972). Außerdem kann das Enzym als NADH-Oxidase fungieren (Bray, 1975), wobei in diesem Fall die Elektronen vom NADH an das FAD übertragen werden.

Erste Hinweise bezüglich der XOR-Struktur lieferte die Strukturaufklärung der ALO aus *D. gigas* (Romão *et al.*, 1995) und der CO-Dehydrogenase (COD) aus *Oligotropha carboxidovorans* (Dobbek *et al.*, 1999). Beide Enzyme dienen auf Grund ihrer Verwandtschaft als Modelle für Struktur und Reaktionsmechanismus der XOR. Die ALO ist ein Homodimer, dessen Untereinheiten zwei [2Fe-2S]-Zentren sowie einen Moco als Cytosin-Dinukleotid enthalten und 23% Identität zu den entsprechenden Domänen der Rinder-XOR zeigen. Die COD beherbergt im Gegensatz zur ALO neben [Fe-S]-Zentren und Moco auch FAD und weist 17% Identität zu allen drei Domänen der Rinder-XOR auf. Obwohl der Modell-basierte Ansatz erste Einblicke insbesondere in die Struktur und Funktion der Moco-Bindungsdomäne lieferte (Huber *et al.*, 1996), ergaben sich kaum Informationen hinsichtlich der FAD-Domäne. Erst im Jahr 2000 wurde die Struktur von Dehydrogenase- und Oxidase-Form des Rinder-Enzyms (Enroth *et al.*, 2000) aufgeklärt und somit die postulierte Anordnung der drei Domänen im Monomer bestätigt, die den internen Elektronentransport in der angenommenen Richtung ermöglicht.

Die bisher beschriebenen Untersuchungen der XOR wurden alle am nativ aufgereinigten Enzym durchgeführt, da sich die Expression von aktiver rekombinanter XOR als schwierig herausstellte. In COS-1 Zellen, einer aus der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) stammenden Zell-Linie, konnte die humane XOR lediglich transient exprimiert werden (Sak-sela u. Raivio; 1996), während Nishino und Mitarbeiter (1997) die XOR aus Ratten in einem Baculovirus-Insektenzellen-System exprimieren konnten. Natives und rekombinantes Enzym zeigten zwar identische Größen, letzteres war jedoch größtenteils inaktiv und bestand aus einer Mischung aus Demolybdo-, Desulfo- und anderen inaktiven Formen (Nishino *et al.*, 2002). Viel versprechender erscheint einerseits die Expression der *D. melanogaster* XOR in *E. nidulans*, die zu Enzymaktivitäten führt, die nicht von denen des nativ aus *D. melanogaster* aufgereinigten Enzyms zu unterscheiden sind (Adams *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 2002). Andererseits gelang es mittlerweile, die Rinder-XOR aktiv im Baculovirus-Insektenzellen-System rekombinant zu exprimieren, was die Möglichkeit der Generierung und Untersuchung von XOR-Mutanten eröffnet (Kuwabara *et al.*, 2003). Ein weiteres Modell-

System für die Untersuchung des XOR-Reaktionsmechanismus' bietet die prokaryotische XDH aus *R. capsulatus*. Das Enzym ist ein $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer, zeigt jedoch starke strukturelle Ähnlichkeiten zur homodimeren XOR der Säuger (Leimkühler *et al.*, 1998). Da sich die *R. capsulatus*-XDH zudem in *E. coli* rekombinant überexprimieren und in aktiver Form aufreinigen lässt, ist sie für weitergehende Analysen der XOR gut geeignet (Leimkühler *et al.*, 2003).

1.3.2 Xanthindehydrogenase in Pflanzen

Im Vergleich mit Tieren und Mikroorganismen wurde die XOR in Pflanzen relativ spät entdeckt. Das Vorkommen von Harnsäureabbauprodukten sowie die dafür notwendigen Enzyme in Pflanzen sind dagegen schon seit langem bekannt. Allantoin wurde z.B. bereits 1881 aus Sprossen der Morgenländischen Platane (*Platanus orientalis*) (Schulze u. Barbieri), und Allantoinsäure im Jahre 1926 aus Bohnenhülsen (Fosse) isoliert. Im Samen des Echten Steinklee (*Melilotus officinalis*) wurde Harnsäure identifiziert und für den Vorläufer von Allantoin und Allantoinsäure gehalten (Fosse *et al.*, 1932a, 1932b). Doch während Allantoinase und Uricase längst bekannt waren (Fosse *et al.*, 1929a, 1929b), wurde in Untersuchungen der Ureid-Synthese die der Uricase vorangehende Reaktion – und damit die Bildung der Harnsäure – nicht beachtet (Brunel u. Echevin, 1938; Brunel u. Capelle, 1947). Fosse und Mitarbeiter vermuteten 1933 zum ersten Mal die Existenz von so genannten „Purinoxidasen“, welche die Synthese von Harnsäure aus Purinen katalysieren könnten. Die XOR wurde jedoch erst 1973 in Blattextrakten einer Prunkwindenart (*Pharbitis nil* syn. *Ipomoea nil*) als NAD⁺-abhängiges Enzym charakterisiert (Nguyen). Kurz darauf konnte XDH-Aktivität in Kallus von Tabak (*Nicotiana tabacum*) (Mendel u. Müller, 1976) und Blättern der Erbse (*Pisum sativum*) nachgewiesen werden (Nguyen u. Feierabend, 1978). Mittlerweile wurde die XOR in der Dehydrogenase-Form nativ aus Wurzelknöllchen der Bohne (Boland, 1981), aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Pérez-Vicente *et al.*, 1988, 1992), aus Weizenblättern (*Triticum aestivum*) und Blättern verschiedener *Fabaceae* (Montalbini, 1998, 2000) sowie aus Erbsensämlingen (Sauer *et al.*, 2002) aufgereinigt. Ähnlich den tierischen XORs sind alle bisher beschriebenen pflanzlichen XDH-Proteine Homodimere mit einer molekularen Masse von ca. 300 kDa und katalysieren neben der Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin die Umsetzung von verschiedenen Aldehyden.

Der pflanzlichen XOR wird abgesehen von der Purin-Degradation eine Bedeutung in weiteren zellulären Prozessen zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die XDH in die Wirt-Pathogen-Interaktionen zwischen phytopathogenen Pilzen wie *Uromyces* oder *Puccinia* und *Fabaceae* bzw. Getreide involviert ist (Montalbini, 1992a, 1992b). Ferner scheint das Enzym bei natürlicher Seneszenz und beim Zelltod infolge hypersensitiver Reaktionen eine Rolle zu spielen (Montalbini, 1995; Montalbini u. Della Torre, 1996). Da diese Vorgänge mit

der Bildung von ROS einhergehen, wird auf die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 durch die XDH geschlossen. Im Einklang mit dieser Hypothese wurde ein Anstieg der XDH-Aktivität in seneszenten Erbsenblättern beobachtet (Pastori u. del Río, 1997).

Einer großen Anzahl an Veröffentlichungen über die tierische XOR stehen vergleichsweise wenige Untersuchungen über das pflanzliche Enzym gegenüber. Mittlerweile sind einige Daten bezüglich der biochemischen Eigenschaften von pflanzlicher XDH verfügbar, diese beruhen jedoch ausschließlich auf der Charakterisierung des nativ aus Pflanzen aufgereinigten Enzyms. In der vorliegenden Arbeit soll deswegen mit der Klonierung der ersten pflanzlichen XDH aus *A. thaliana* zum einen die molekulare Analyse des Enzyms erfolgen. Zum anderen soll das Protein rekombinant überexprimiert und dadurch für weitere biochemische Analysen verfügbar gemacht werden. Parallel dazu soll die Untersuchung der XDH-Expression in *A. thaliana* unter verschiedenen Bedingungen sowie die Analyse von XDH-„knock out“-Mutanten in *A. thaliana* die physiologische Bedeutung des Enzyms für die Pflanze aufklären.

2 Ergebnisse

2.1 Isolation und Charakterisierung der XDH-Gene in *A. thaliana*

Eine Datenbankabfrage in „The Arabidopsis Information Resource“ (TAIR) mit der Rinder-XDH cDNA als Suchsequenz unter Verwendung von BlastX zeigte zwei putative XDH-Gene in *A. thaliana* auf, die sich in Tandem-Orientierung auf Chromosom 4 befinden und eine weit-aus größere Ähnlichkeit zu XORs als zu AOs aufwiesen. Bezogen auf den BAC-Klon AL079347/ATF11111 liegen die beide putativen Gene, annotiert als T11111.130 und T11111.140, in dessen Zentrum, wobei die offenen Leseraster in dieselbe Richtung weisen und nur durch 704 bp voneinander getrennt sind (Abb. 2-1A). Das vorhergesagte Gen T11111.130 reicht von Position 50304 für das Start-ATG bis Position 44057 (Stop-TGA) und wird im folgenden mit *AtXDH1* bezeichnet. Analog dazu wird T11111.140 als *AtXDH2* charakterisiert und reicht von Position 56627 (ATG) bis 51009 (TGA). Für beide putativen Gene wurden „expressed sequence tags“ (ESTs) in den Datenbanken gefunden, die einerseits belegen, dass beide Gene tatsächlich transkribiert werden, und außerdem die vorhergesagten Translations-Start- und -Endpunkte bestätigen. Weitere putative XDH-Gene konnten über Datenbankanalysen im Genom von *A. thaliana* nicht ausfindig gemacht werden.

2.1.1 Klonierung der *AtXDH1* cDNA

Bei Datenbankanalysen wurde ein *A. thaliana* EST mit der GenBank Accession Nr. AV548322 gefunden, der homolog zum 5'-Bereich des *AtXDH1*-Gens ist. Der entsprechende Klon RZL51g03 konnte in Form einer in pBluescript klonierten cDNA über das Kazusa DNA Research Institute (Chiba, Japan) bezogen werden. Die vollständige Sequenzierung ergab, dass der EST ein einziges offenes Leseraster von 4083 Basen und somit die komplette *AtXDH1*-cDNA inklusive der 3'-nichtcodierenden Region enthält. Der tatsächliche Start- und Endpunkt der Translation entspricht dem des vorhergesagten Gens, während sich hinsichtlich der codierenden Region eine Abweichung ergab. Die vorliegende *AtXDH1* cDNA besteht aus 14 Exons, das entsprechende Gen T11111.130 enthält demnach 13 Introns, deren genaue Länge Abb. 2-1B zu entnehmen ist. Es codiert damit für ein Protein aus 1361 Aminosäuren.

2.1.2 Klonierung der *AtXDH2* cDNA mittels RT-PCR

Für das *AtXDH2*-Gen zeigten Datenbankanalysen entsprechende ESTs sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich, wobei diese bis auf Translations-Start und -Stop stark von der vorhergesagten putativen cDNA abwichen. Aus diesem Grund wurde versucht, die tatsächliche *AtXDH2*-cDNA mittels RT-PCR zu isolieren. Auf der Grundlage des Datenbankeintrages

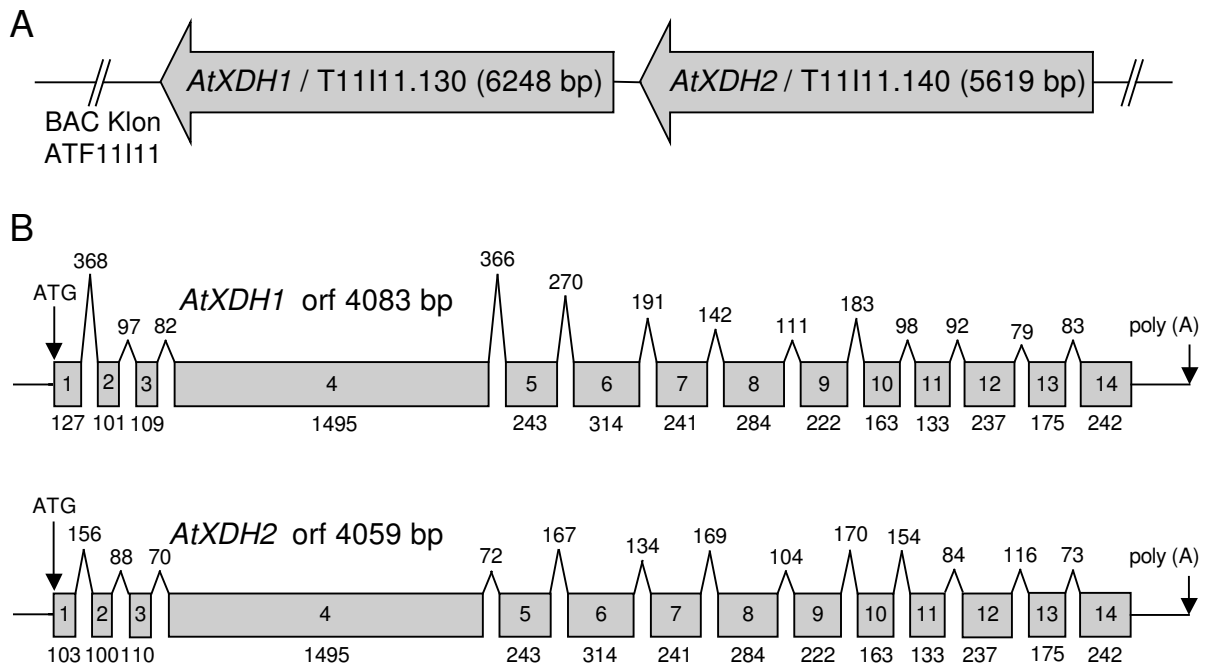


Abb. 2-1: Genomische- und cDNA-Struktur von *AtXDH1* und *AtXDH2*.

(A) Tandem-Ausrichtung beider Gene auf Chromosom 4, dargestellt anhand des BAC-Klones ATF11111. Die Pfeile geben die Orientierung wider. (B) Exon/Intron-Struktur beider Gene. Die Größen der Exons (graue Boxen) und Introns (Spitzen) sind in Basenpaaren angegeben, außerdem ist die Gesamtlänge der offenen Leserraster angegeben (orf = „open reading frame“).

T11111.140 wurden Primer gesetzt, die einerseits die Amplifikation der *AtXDH2*-cDNA in voller Länge sowie die eines 2 kb großen Teilfragmentes im 3'-Bereich ermöglichen sollten. Durch den Einsatz eines Gradienten-Cyclers konnten verschiedene Annealing-Temperaturen getestet werden. Als Template für die PCR dienten Aliquots einer revers transkribierten Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Col-0 Blättern.

Wie in Abb. 2-2 zu erkennen, führte die PCR mit der Primerkombination XDH2_2047+ und XDH2_3'XhoI zu mehreren Amplifikaten, deren Intensität bei steigender Annealing-Temperatur größtenteils zurückging. Eine Bande von ca. 2 kb entspricht in der Größe dem erwarteten cDNA-Amplifikat. Diese Bande sowie ein 3,2 kb großes Fragment erreichten bei 60,3°C

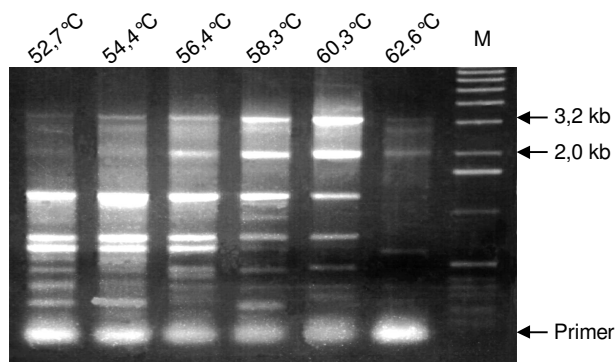


Abb. 2-2: Ergebnis der RT-PCR mit den Primern XDH2_2047+ und XDH2_3'XhoI bei verschiedenen Annealing-Temperaturen.

Als Template für eine PCR mit 40 Zyklen dienten je 1,5 µl einer RT-Reaktion mit *A. thaliana* Col-0 Blatt Gesamt-RNA. Je 5 µl der PCR wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt; die verwendeten Annealingtemperaturen sind über den Spuren angegeben (M = Marker).

die maximale Intensität, was auf eine spezifische Amplifikation hinweisen könnte. Beide Banden wurden daher aus dem Gel eluiert, in den Vektor pGEM-Teasy kloniert und sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass es sich bei der kleineren Bande um das erwartete 2049 bp-Fragment aus dem 3'-Bereich der *AtXDH2*-cDNA handelte, während die 3,2 kb-Bande mit dem entsprechenden genomischen Bereich übereinstimmte. Die Primerpaarung XDH2_5'XhoI und XDH2_3'XhoI, mit der die gesamte cDNA amplifiziert werden sollte, führte unter den getesteten PCR-Bedingungen zu keinem Ergebnis. Auch mit weiteren Primerkombinationen, die im 5'-Bereich der *AtXDH2*-cDNA binden sollten, konnten keine Amplifikate erzielt werden. Deshalb wurde eine Hybrid-cDNA zusammengesetzt, bestehend aus dem amplifizierten 3'-2 kb-Fragment und dem 5'-EST AU238070 im Überlapp mit der cDNA AK117254. Diese cDNA scheint aus einer unvollständig gespleißten mRNA hervorgegangen zu sein, da Intron 4 noch in der Sequenz enthalten ist, wodurch es zu einem vorzeitigen Abbruch des offenen Leserasters nach 1866 bp kommt. Alle weiteren Exon-Intron Übergänge stimmen jedoch mit dem 5'-EST bzw. mit dem RT-PCR-Fragment überein. So ergibt sich für die tatsächliche *AtXDH2*-cDNA ein offenes Leseraster von 4059 Basen, welches wie bei der *AtXDH1*-cDNA aus 14 Exons besteht (Abb. 2-1B) und für ein Protein aus 1353 Aminosäuren codiert.

Die wie beschrieben isolierten cDNA-Sequenzen von *AtXDH1* und *AtXDH2* wurden bei GenBank™ hinterlegt und erhielten die Accession Nr. AY171562 für *AtXDH1* bzw. AY518202 für *AtXDH2*. Die vollständigen cDNA- und Protein-Sequenzen sind außerdem im Anhang dieser Arbeit zu finden.

Spleißvariante der AtXDH2 cDNA

Neben dem beschriebenen *AtXDH2*-Fragment von 2049 bp wurde mit derselben Primerpaarung mehrfach ein 1985 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert, welches ebenfalls sequenziert wurde. Bei dieser Spleißvariante der *AtXDH2*-cDNA ist Exon 12 um 64 bp verkürzt durch Verschieben der Spleiß-Akzeptorseite (Intron-Exon Übergang) unter Einhaltung der GT/AG-Regel. Durch das alternative Spleißen kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters an Position 3446, die letztendlich zu einem vorzeitigen Abbruch nach Position 3525 führt.

2.1.3 Phylogenetische Analyse

Die beiden isolierten XDHs aus *A. thaliana* sind sowohl auf Protein- als auch auf Nukleinsäureebene untereinander zu 93% identisch. Insbesondere die Exon-Intron Übergänge sind hochkonserviert und weisen lediglich im 5'- und 3'-Bereich von Exon 2 wenige Basenaustausche auf. Das *AtXDH1*-Protein weist 47% Identität zu humaner- und Rinder-XDH auf, bei der

AtXDH2 sind es 46%. Beide Proteine zeigen dagegen lediglich 29-31 % Identität zu den AO-Proteinen aus *A. thaliana*. Dies deutet stark darauf hin, dass es sich um XDHs handelt, die zwar den AOs ähneln, sich jedoch funktionell von diesen unterscheiden.

Um herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt der Evolution die Genduplikation in *A. thaliana* entstanden ist, wurden die phylogenetischen Beziehungen verschiedener eukaryotischer XDH-Proteine untersucht (Abb. 2-3). Drei AOs aus *A. thaliana* wurden als Außengruppe festgelegt, da sie zu den XDHs homolog, aber dennoch funktionell andersartig sind. Die ausgewählten XDH-Sequenzen zeigen eine Aufteilung in drei Gruppen, wobei die pflanzlichen XDHs eine eigene monophyletische Untergruppe neben den tierischen und pilzlichen XDHs bilden. Bisher sind außer einer Reis (*Oryza sativa*)-cDNA keine weiteren pflanzlichen XDH-Sequenzen bekannt. Die verwendete *C. reinhardtii* Proteinsequenz beruht daher auf einer tblastn-Suche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit dem AtXDH1-Protein gegen das *C. reinhardtii*-Genom. Die erhaltenen genomischen Klone 255, 2509, 3834 und 481 wurden mit Hilfe von GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) auf ihre Exon-Intron Struktur hin überprüft und anschließend *in silico* translatiert. Diese Analysen zeigen, dass die durchsequenzierten Genome von *O. sativa* und *C. reinhardtii* im Gegensatz zu *A. thaliana* jeweils nur ein einziges XDH-Gen enthalten, und dass die Genduplikation in *A. thaliana* scheinbar weit nach der Trennung von mono- und dikotylen Pflanzen stattgefunden hat. Dementsprechend handelt es sich evolutiv gesehen um ein Ereignis der jüngeren Vergangenheit. Innerhalb der Tiere gruppieren die Nematoden separat von den Insekten und den Wirbeltieren. Basierend auf den Ähnlichkeiten der Proteinsequenzen untereinander verdeutlicht dieser phylogenetische Baum, dass AtXDH1 und AtXDH2 tatsächlich XDHs und keine AOs sind.

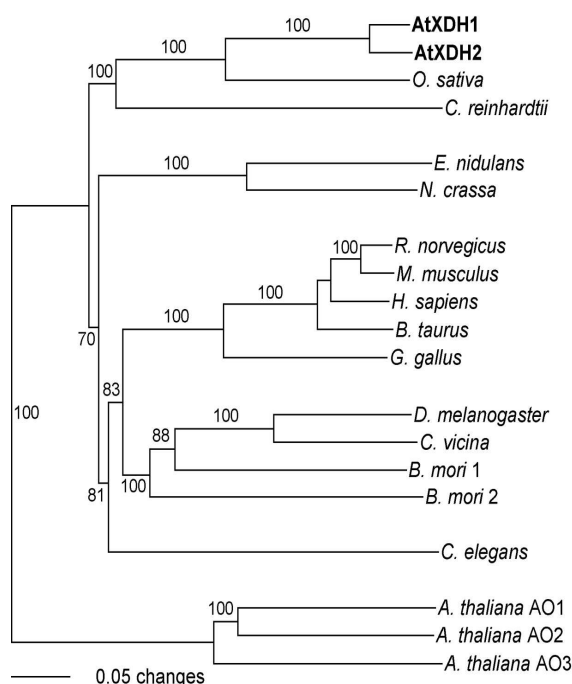


Abb. 2-3: Phylogenetischer Stammbaum eukaryotischer XOR-Proteine.

Die vollständigen Proteinsequenzen wurden mit ClustalP aligniert, anschließend wurde nach der „neighbour joining“-Methode unter Verwendung von PAUP 4.0 ein mit festgelegter Außengruppe gewurzelter Baum erstellt. Die Bootstrap-Werte wurden aus 100 unabhängigen Stichproben generiert. GenBank Accession Nr. der als Außengruppe festgelegten *A. thaliana* AOs: AO1 (BAA28624), AO2 (BAA28625), AO3 (BAA82672). GenBank Accession Nr. der XOR-Sequenzen: AtXDH1 (AY171562), AtXDH2 (AY518202), *C. elegans* (NP_502747) *C. reinhardtii* (nicht verfügbar) *O. sativa* (cDNA: AK065099), *E. nidulans* (CAA58034), *N. crassa* (EAA27223), *H. sapiens* (P47989), *R. norvegicus* (P22985), *M. musculus* (CAA44705), *B. taurus* (CAA58497), *G. gallus* (P47990), *D. melanogaster* (S07245), *C. vicina* (JQ0407), *B. mori* XDH1 (BAA21640), *B. mori* XDH2 (BAB47183).

2.2 Regulation und Expression von AtXDH1 und AtXDH2

Das Vorhandensein von zwei allem Anschein nach exprimierten XDH-Genen in *A. thaliana* wirft die Frage nach deren Regulation auf. Um einen Einblick in die Situation *in vivo* zu bekommen, sollten Expressionsstudien auf mRNA-Ebene durchgeführt sowie die entsprechenden XDH-Aktivitäten in Pflanzen-Rohextrakten bestimmt werden.

2.2.1 Untersuchung von Transkription und Enzymaktivitäten

Aufgrund der hohen Identität und annähernd gleichen Größe beider mRNAs ist es unmöglich, die Transkripte von AtXDH1 und AtXDH2 in einer Northern-Blot Hybridisierung getrennt voneinander nachzuweisen. Aus diesem Grund wurden die Transkriptmengen mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht. Spezifische Primer wurden im 3'-Bereich der cDNAs gesetzt, mit deren Hilfe ein 693 bp-Fragment der AtXDH1 bzw. ein 279 bp-Fragment der AtXDH2 amplifiziert wurde. Durch Sequenzieren der aufgereinigten Fragmente wurde zunächst sichergestellt, dass es sich um korrekte Amplifikate der jeweiligen cDNA handelt, bevor die PCR zur Analyse verschiedener RT-Reaktionen eingesetzt wurde. Jede RT-PCR wurde zur Kontrolle mindestens dreimal durchgeführt, um zu repräsentativen Ergebnissen zu gelangen.

Wie in Abb. 2-4 gezeigt, konnte mRNA-Expression beider XDHs in Wurzeln, Blättern, Stängeln, Blüten und Schoten nachgewiesen werden, jedoch mit unterschiedlicher Intensität. Auch XDH-Aktivität wurde in allen untersuchten Geweben gefunden. Der *in Gel*-Aktivitätsnachweis erlaubt allerdings keinen Rückschluss darauf, von welcher XDH-Isoform die gezeigten Aktivitäten stammen. Beide XDH-Proteine lassen sich auf Grund ihrer hohen

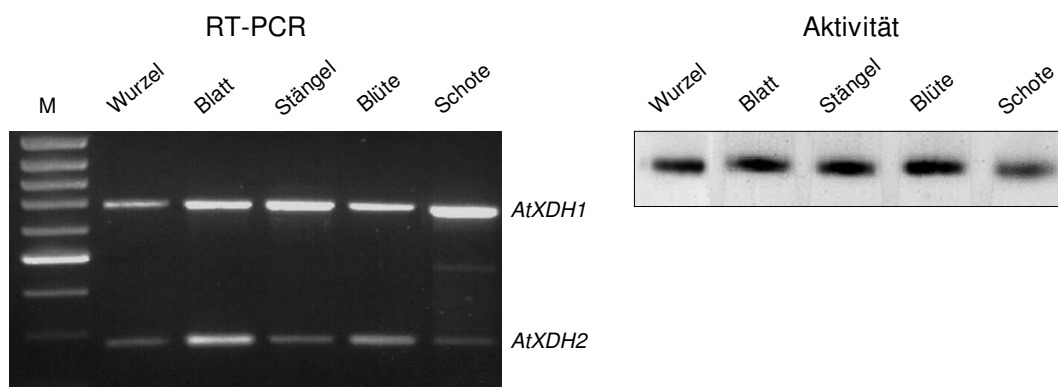


Abb. 2-4: Expression von AtXDH1 und AtXDH2 in verschiedenen Geweben.

Relative Expression von *AtXDH1* und *AtXDH2* mRNA (*links*). Von jeder RT-PCR wurden 10 µl im 2%igen Agarosegel aufgetrennt (M = 100 bp Leiter, oberste Bande = 1000 bp). Bestimmung der XDH-Aktivität im nativen 7,5% PA-Gel mit Hypoxanthin als Substrat (*rechts*). Pro Spur wurden 80 µg Proteinrohextrakt aufgetragen.

Identität und damit verbundenen gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften im nativen PA-Gel nicht separieren. Ferner besteht die Möglichkeit, dass nur eine Isoform tatsächlich translatiert wird bzw. aktiv ist.

Die Untersuchung der relativen mRNA-Expression von *AtXDH1* und *AtXDH2* in Blättern verschiedener Altersstadien zeigt einen Anstieg des *AtXDH1* mRNA-Gehalts in alternden und seneszenten Blättern, während die *AtXDH2*-Transkriptmenge unverändert bleibt und somit als interner Standard fungiert (Abb. 2-5). In den korrespondierenden Pflanzenextrakten wurde neben der XDH- auch die AO-Aktivität nachgewiesen; zusätzlich wurden Blätter mit hohem Anthocyan-Gehalt untersucht, der wahrscheinlich durch eine künstlich verlängerte Generationsdauer hervorgerufen wurde. Die XDH-Aktivität ist vom Keimling bis zum alternden Blatt gleich bleibend, steigt jedoch in seneszenten Blättern stark an. Auch in den rot gefärbten Blättern ist eine erhöhte Aktivität zu erkennen. Die Aktivität der drei AOs ist dagegen in Keimlingen am höchsten; daraus kann auf eine getrennte Regulierung von XDH und AOs geschlossen werden.

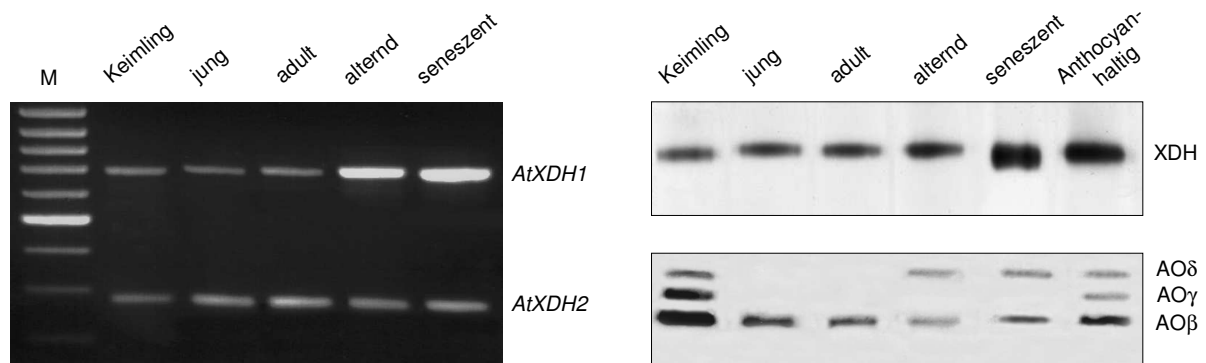


Abb. 2-5: XDH-Expression in unterschiedlich alten Blättern.

Je 10 μ l RT-PCR wurden im 2%igen Agarosegel (*links*) bzw. je 60 μ g Pflanzenrohextrakt im nativen 7,5% PA-Gel (*rechts*) aufgetrennt. Die XDH-Aktivität wurde mit Hypoxanthin, die AO-Aktivitäten wurden mit Indol-3-carbaldehyd und 1-Naphthaldehyd als Substrat untersucht (M = 100 bp Leiter, oberste Bande = 1000 bp).

Im Tagesgang bleibt das Transkript der *AtXDH2* in Blatt und Wurzel wiederum unverändert, während zwischen 9 Uhr und 18 Uhr eine leichte Erhöhung der *AtXDH1* mRNA-Menge sowohl in Blättern als auch in Wurzeln zu erkennen ist (Abb. 2-6). Umgekehrt dazu zeigt die XDH-Aktivität in Blättern während der Lichtperiode einen leichten Rückgang im Vergleich zur Nacht.

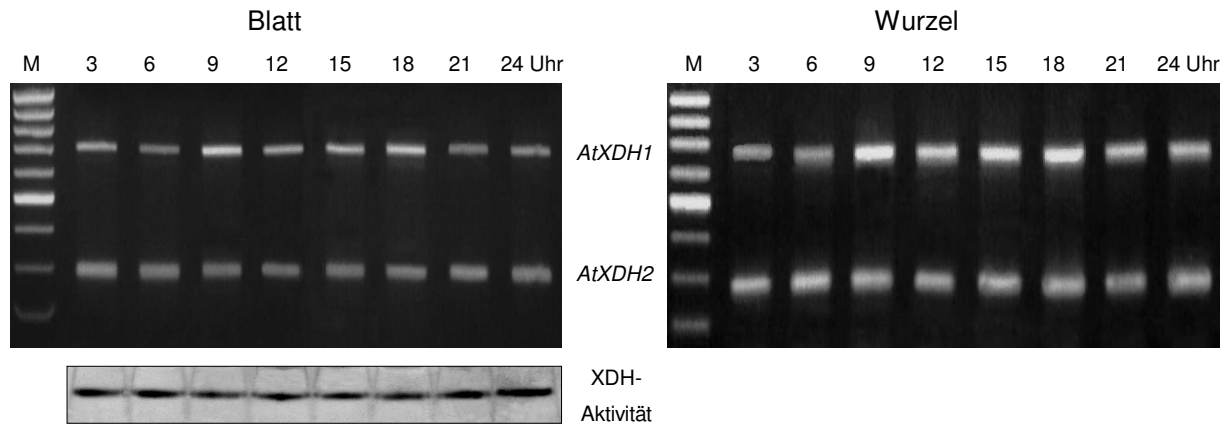


Abb. 2-6: Expression von AtXDH1 und AtXDH2 im Tagesgang.

Die Photoperiode dauerte von 7 Uhr bis um 23 Uhr. 2%ige Agarosegele wurden mit je 10 µl RT-PCR beladen; im nativen 7,5% PA-Gel wurden je 80 µg Blatt-Rohextrakt aufgetragen und mit Hypoxanthin als Substrat gefärbt (M = 100 bp Leiter, oberste Bande = 1000 bp).

2.2.2 Einfluss abiotischer Stresse

Da in Mais (*Zea mays*) eine Salzbehandlung zu Veränderungen der XDH-Aktivität führte (Barabás *et al.*, 2000), wurden *A. thaliana*-Pflanzen verschiedenen Stressen ausgesetzt und deren Einfluss auf die Expression der XDH untersucht. Ein Trocknungsprozess von 4 Stunden, der das Frischgewicht der Pflanzen um 50% verringerte, führte zu einem Anstieg der *AtXDH1* mRNA in Blättern bei gleichzeitig starkem Rückgang in den Wurzeln, während die *AtXDH2* Transkript-Menge unverändert bleibt (Abb. 2-7A). Um herauszufinden, ob die Variationen auf Transkriptebene direkt durch den eigentlichen Trockenstress hervorgerufen oder durch die damit einhergehende Bildung von ABA vermittelt werden, wurden Pflanzen mit einer ABA-Lösung behandelt und getestet. Neben dem Wildtyp wurde eine *aba3*-Mutante untersucht, die Trockenstress mit und ohne vorhergehender ABA-Behandlung ausgesetzt wurde. Diese Mutante ist auf Grund einer Mutation in der Moco-Sulfurase nicht in der Lage, AO und XDH durch Sulfurierung zu aktivieren. Somit unterbleibt eine Stressantwort, die durch von der AO gebildete ABA vermittelt wird (Bittner *et al.*, 2001). Sowohl der Wildtyp als auch die *aba3*-Mutante akkumulieren *AtXDH1* mRNA nach ABA-Behandlung, während Trockenstress alleine kaum einen Anstieg in der *aba3*-Mutante bewirkt (Abb. 2-7B).

Passend zur Transkriptveränderung steigt die XDH-Aktivität im Wildtyp ebenfalls im Blatt an und nimmt in der Wurzel ab, wobei die maximalen Veränderungen bereits 4 Stunden nach Beginn der Austrocknung erreicht sind (Abb. 2-7A). In Abb. 2-7B ist zu erkennen, dass auch die ABA-Behandlung einen leichten Anstieg der XDH-Aktivität verursacht.

Salz- und Kältestress führen ebenso lediglich zu Veränderungen der *AtXDH1* mRNA, während die *AtXDH2* mRNA mit unveränderter Stärke exprimiert wird. Nach der Applizierung von

200 mM NaCl kommt es nach 20 Stunden zu einem starken Anstieg des *AtXDH1* Transkripts, andauernde Kälte bei 4°C sowie ein kurzfristiger Froststress von -4°C führen dagegen zu einem Rückgang der mRNA-Menge. Die starke Veränderung der Transkriptmenge nach Salzstress wird auf Aktivitätsebene nicht widerspiegelt; Kälte- und Frost-Behandlung hingegen führen, dem *AtXDH1* mRNA-Rückgang entsprechend, auch zu einer Abnahme der Aktivität. Alle untersuchten Stresse beeinflussen demnach direkt oder indirekt die Expression der *AtXDH1* mRNA bzw. die XDH-Aktivität in Rohextrakten so behandelter Pflanzen.

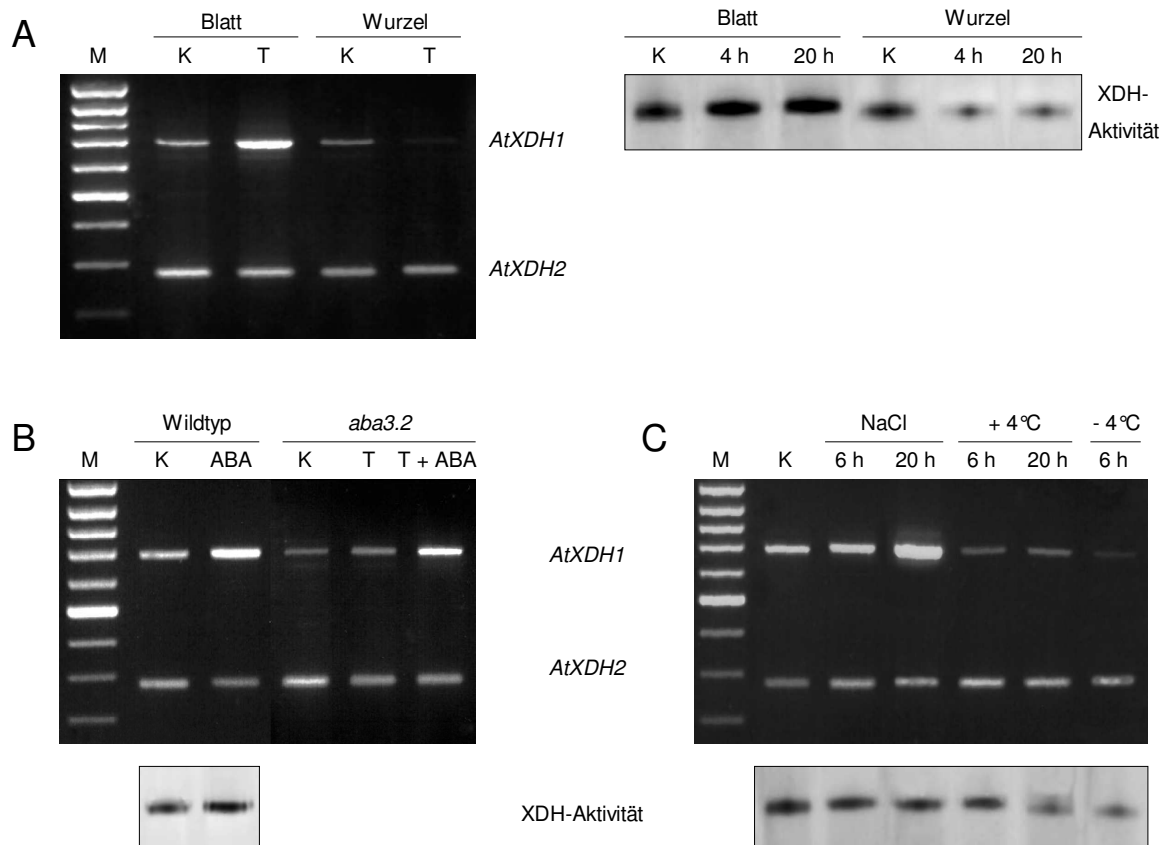


Abb. 2-7: XDH-Expression unter verschiedenen Stressen.

Relative mRNA-Expression sowie XDH-Aktivität nach Trockenstress (**A**), nach ABA-Behandlung von Wildtyp und *aba3.2*-Mutante (**B**) sowie nach Salz-, Kälte- und Froststress (**C**). Je 10 µl RT-PCR im 2%igen Agarosegel bzw. je 80 µg Rohextrakt im 7,5% PA-Gel; Färbung mit Hypoxanthin als Substrat. (M = 100 bp Leiter, oberste Bande = 1000 bp; K = Kontrolle; T = 4 h Trockenstress)

2.2.3 Analyse der putativen Promotor-Regionen

Jeweils 2 kb umfassende Bereiche vor dem Start-ATG von *AtXDH1* und *AtXDH2* wurden datenbankgestützt auf mögliche Promotorelemente hin untersucht. Da die vorangegangenen RT-PCR Experimente eine stressabhängige Regulation vermuten lassen, wurde besonderes Augenmerk auf bekannte Stress-regulierte Promotorelemente gelegt. In Tab. 2-1 sind die in

den putativen Promotoren enthaltenen Motive aufgeführt. So finden sich im Bereich des AtXDH1 Promotors neben W-Box Elementen, an die die elicitorinduzierten WRKY-Transkriptionsfaktoren binden können und G-Box Elementen, den Bindungsorten der GBF-Proteine, zwei durch ABA regulierte Elemente sowie ein bei Trockenstress wirksames Element (DRE). Bemerkenswert ist auch das häufige Auftreten der Opaque2 und ROM2 Bindungselemente in beiden Promotor-Bereichen. Opaque2 und ROM2 gehören zur Klasse der basischen Leucin-„Zipper“ Proteine und sind insbesondere während der Samenreifung aktiv (Chern *et al.*, 1996; Yunes *et al.*, 1994).

Diese Analysen bestätigen die Annahme, dass die AtXDH1 sehr stark reguliert ist und wahrscheinlich das wichtigere Isoenzym für die Pflanze darstellt. Deshalb wurde die AtXDH1 für die heterologe Expression und die biochemische Charakterisierung ausgewählt.

Tab. 2-1: Promotor-Elemente im genomischen 5'-Bereich beider XDHs.

(ABRE = abscisic acid responsive element; DRE = drought responsive element; W-Box = WRKY-Bindungsstelle; G-Box = GBF-Bindungsstelle; O2 [Opaque2] und ROM2 = bZIP-Transkriptionsfaktoren)

Bezeichnung	Sequenz	Position stromaufwärts vom	
		AtXDH1 ATG	AtXDH2 ATG
ABRE	ACACNNG	-1378; -374	—
DRE	(TA)CCGAC(AT)	-1928	-1530; -1487
W-Box	TTGACY	-1349; -576; -187; -28	—
W-Box ähnlich	BBWGACYT	-28	-1319
G-Box core Element	ACGT	-1879; -1524	—
AtMyb4-Bindungsstelle	AMCWAMC	-525; -430	-1898; -1288; -864
O2-Box core Element	CATG	-964; -619; -609; -602	kommt 8x vor
ROM2-Box core	ACCT	kommt 5x vor	kommt 13x vor

Transgene Promotor-GUS Pflanzen

Um die Regulation der beiden XDH-Promotoren besser untersuchen zu können, wurden die bereits erwähnten 2 kb-Fragmente stromabwärts vom Start-ATG vor das Reportergen GUS kloniert und stabil in *A. thaliana* transformiert. Dazu wurde eine genomische PCR mit mutagenisierenden Primern durchgeführt, die jeweils direkt vor dem ATG beider XDH-Gene eine *Nco*I-Schnittstelle und 2 kb stromabwärts eine *Eco*RI-Schnittstelle in die Promotor-Regionen einfügten. Eine aus dem Vektor pRT103 stammende 35S CaMV::GUS-Kassette wurde in pBS zwischengeklont und dort der 35S-Promotor gegen die amplifizierten XDH-Promotoren ausgetauscht. Die Promotor-GUS-Elemente wurden über *Eco*RI und *Hind*III in pBIN19 kloniert, und die entstandenen Konstrukte pBIN19 XDH1 P::GUS bzw. pBIN19 XDH2 P::GUS

wurden mittels *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Vakuuminfiltration stabil in *A. thaliana* transformiert.

Nach Selektion von kanamycinresistenten Pflanzen der T1-Generation wurden isolierte Pflanzen fluorimetrisch auf Expression des GUS-Gens hin untersucht. Sowohl Transformanten mit dem AtXDH1-Promotor als auch mit dem AtXDH2-Promotor zeigten eine deutliche Expression des GUS-Gens (Tab. 2-2). Ein applizierter Trockenstress über 4 Stunden führte in einer XDH1 P::GUS-Transformante zu einer 8fachen Steigerung der GUS-Expression. Dieses aufgrund von Materialmangel nur einmal durchgeführte Experiment bestätigt dennoch eindrucksvoll die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR. Die erzeugten GUS-Pflanzen stellen folglich ein geeignetes Material für weitergehende Expressions-Analysen dar.

Tab. 2-2: Fluorimetrische Bestimmung der GUS-Aktivität transgener *A. thaliana*.

Es sind Mittelwerte aus je drei Messungen abgebildet (*oben*) bzw. Einzelmesswerte (*unten*).

Pflanze	rel. Fluoreszenz/h μg
Wildtyp	1625 \pm 89
XDH1 P GUS	4075 \pm 136
XDH2 P GUS	13735 \pm 248
Wildtyp	801
XDH1 P GUS Kontrolle	1644
XDH1 P GUS Trockenstress	15050

2.3 Analyse von *A. thaliana* XDH T-DNA Insertions-Mutanten

Bei Datenbankabfragen mit der *AtXDH1* und der *AtXDH2* als Suchsequenz wurde für beide Gene jeweils eine mittels T-DNA Insertion erzeugte „knock out“-Mutante gefunden. Die GABI-Kat Linie 049D04 mit einer Integration im *AtXDH1*-Gen, im folgenden mit AtXDH1-ko bezeichnet, wurde vom MPI für Züchtungsforschung in Köln zur Verfügung gestellt, während die SALK Linie 015081, entsprechend AtXDH2-ko genannt, über das Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) bezogen werden konnte. Die Untersuchung beider Linien sollte Hinweise auf die Bedeutung der einzelnen XDH-Proteine für die Pflanze liefern sowie die Regulation von AtXDH1 und AtXDH2 aufzuklären helfen. Vor der physiologischen und biochemischen Charakterisierung sollte die molekulare Charakterisierung der Mutanten belegen, dass es sich tatsächlich um einen „knock out“ des *AtXDH1*- bzw. des *AtXDH2*-Gens

handelt. Wie von den auf diesem Gebiet führenden Instituten SALK und ZIGIA empfohlen, sollte dabei lediglich die Integration der linken Grenze bestätigt werden.

2.3.1 Molekulare Charakterisierung

Um zu überprüfen, ob an der angegebenen Stelle tatsächlich eine T-DNA Integration vorhanden ist, war die Isolierung der die T-DNA flankierenden genomischen Bereiche erforderlich. Dies erfolgte mit Hilfe der inversen PCR, da die Sequenzen der verwendeten T-DNA Vektoren, pAC161 bei der AtXDH1-ko sowie pROK2 bei der AtXDH2-ko, bekannt waren. Zunächst wurde dazu genomische DNA mit *EcoRI* und *SacI* im Fall der AtXDH1-ko Linie bzw. mit *BglII* und *HindIII* bei der AtXDH2-ko Linie verdaut. Diese Enzyme schneiden jeweils einmal innerhalb der integrierten T-DNA. Anschließend wurden die erhaltenen Fragmente religiert in der Hoffnung, dabei Fragmente aus partieller T-DNA und flankierenden genomischen Bereichen zu erhalten. Mit Hilfe von spezifischen Primern, die jeweils innerhalb der T-DNA binden, aber in Richtung der flankierenden Bereiche weisen, wurde die angrenzende genomische DNA inklusive der T-DNA Endstücke amplifiziert.

Die inverse PCR mit genomischer DNA der AtXDH1-ko Linie als Template ergab ein die linke Grenze flankierendes Fragment von 1700 bp Größe. Nach Klonierung des Fragments in den Vektor pGEM-Teasy ergab die anschließende Sequenzierung zweier Klone, dass die Integration der T-DNA nach Position 2137 ab Start-ATG im Gen der *AtXDH1* erfolgte. Damit konnte der im Datenbankeintrag der Linie 049D04 angegebene Ort der T-DNA Integration exakt bestätigt werden. Dieser entspricht der Position 1590 in Exon 4 der cDNA (Abb. 2-8), d.h. die Integration befindet sich im codierenden Bereich des Gens und sollte dessen korrekte Translation unterbinden.

Im Fall der AtXDH2-ko Linie erzeugte die inverse PCR zwei die linke Grenze flankierende 650 bp und 450 bp große Fragmente. Diese Fragmente wurden ebenfalls in pGEM-Teasy kloniert und anschließend sequenziert. Die anhand beider Fragmente bestätigte Integration nach 2355 bp ab Start-ATG entspricht wiederum exakt der für die Linie 015081 angegebenen Position der T-DNA Integration. Auch in diesem Fall befindet sich die Integration im codierenden Bereich des Gens in Exon 5 bzw. nach 1968 bp der korrespondierenden cDNA (Abb. 2-8) und beeinträchtigt dadurch deren Translation erheblich. Die durchgeführten Untersuchungen rechtfertigen damit die Bezeichnung der vorliegenden *A. thaliana* Linien als XDH-„knock out“ Mutanten.

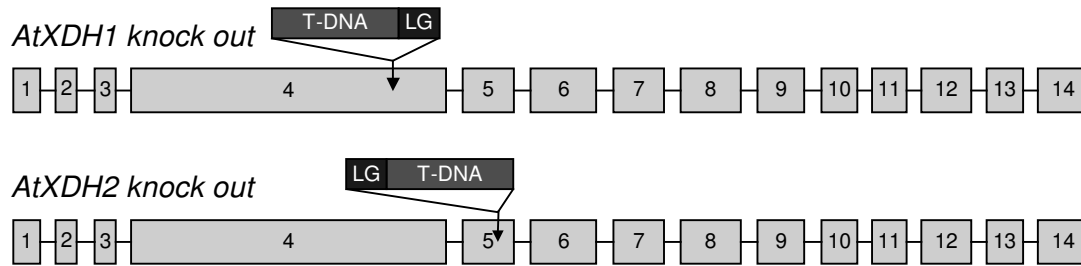


Abb. 2-8: Integrationsorte der linken Grenzen der T-DNAs in *AtXDH1* bzw. *AtXDH2*.

Die Exons sind als graue Boxen dargestellt. Die Sequenzen der mittels inverser PCR generierten Fragmente beider Linien im Vergleich mit dem jeweiligen XDH-Gen befinden sich im Anhang dieser Arbeit (LG = linke Grenze).

2.3.2 Physiologische und biochemische Charakterisierung

Die erhaltenen Samen der *A. thaliana* XDH-ko Linien wurden in Anzuchterde ausgesät und zeigten hinsichtlich des Keimungsverhaltens keine Unterschiede zum entsprechenden Wildtyp *A. thaliana* Col-0. Unter Standard-Kulturbedingungen wuchsen die Keimlinge innerhalb von 4 Wochen zu kräftigen Pflanzen heran, die im Habitus mit dem Wildtyp übereinstimmten (Abb. 2-9A). Auch die Untersuchung der XDH-Aktivität in Blättern dieser Pflanzen zeigte keine Unterschiede zwischen Wildtyp und den XDH-ko Pflanzen (Abb. 2-9C). Im Anschluss an die Blühphase bildete die *AtXDH2*-ko zeitgleich zum Wildtyp Samen aus. An der *AtXDH1*-ko entstanden zwar Schoten, in diesen entwickelten sich jedoch keine Samen, so dass es bisher nicht möglich war, weiteres Saatgut der *AtXDH1*-ko Linie zu gewinnen.

In einer weiteren Anzucht führte eine veränderte Beleuchtung im Pflanzen-Wuchsschrank zu einer künstlich verlängerten Generationsdauer der Pflanzen. Unter diesen Bedingungen zeigten beide XDH-ko Linien einen ausgeprägten, aber unterschiedlichen Phänotyp (Abb. 2-9B). Die *AtXDH1*-ko war kleinwüchsig und stark chlorotisch im Habitus; die *AtXDH2*-ko blieb im Wachstum ebenfalls weit hinter dem Wildtyp zurück, entwickelte jedoch nur schwach chlorotische Blätter. Die XDH-Aktivität spiegelte diesen Phänotyp wider (Abb. 2-9D). Im Vergleich zum Wildtyp zeigten beide XDH-ko Linien eine deutlich verringerte Aktivität im Blatt, wobei auch hier die *AtXDH1*-ko stärker beeinträchtigt war als die *AtXDH2*-ko Linie.

Unter Standard-Kulturbedingungen herangezogene Pflanzen ohne Phänotyp wurden bis zum Stadium der natürlichen Seneszenz kultiviert, um in seneszenten Blättern sowie in jüngeren Folgeblättern die XDH-Aktivität zu bestimmen (Abb. 2-9E). In den adulten Blättern waren kaum Unterschiede zwischen Wildtyp und XDH-ko Linien zu erkennen, während in seneszenten Blättern der Wildtyp ebenso wie die *AtXDH2*-ko eine stark erhöhte XDH-Aktivität zeigten. Die Aktivität in der *AtXDH1*-ko Linie blieb dagegen unverändert.

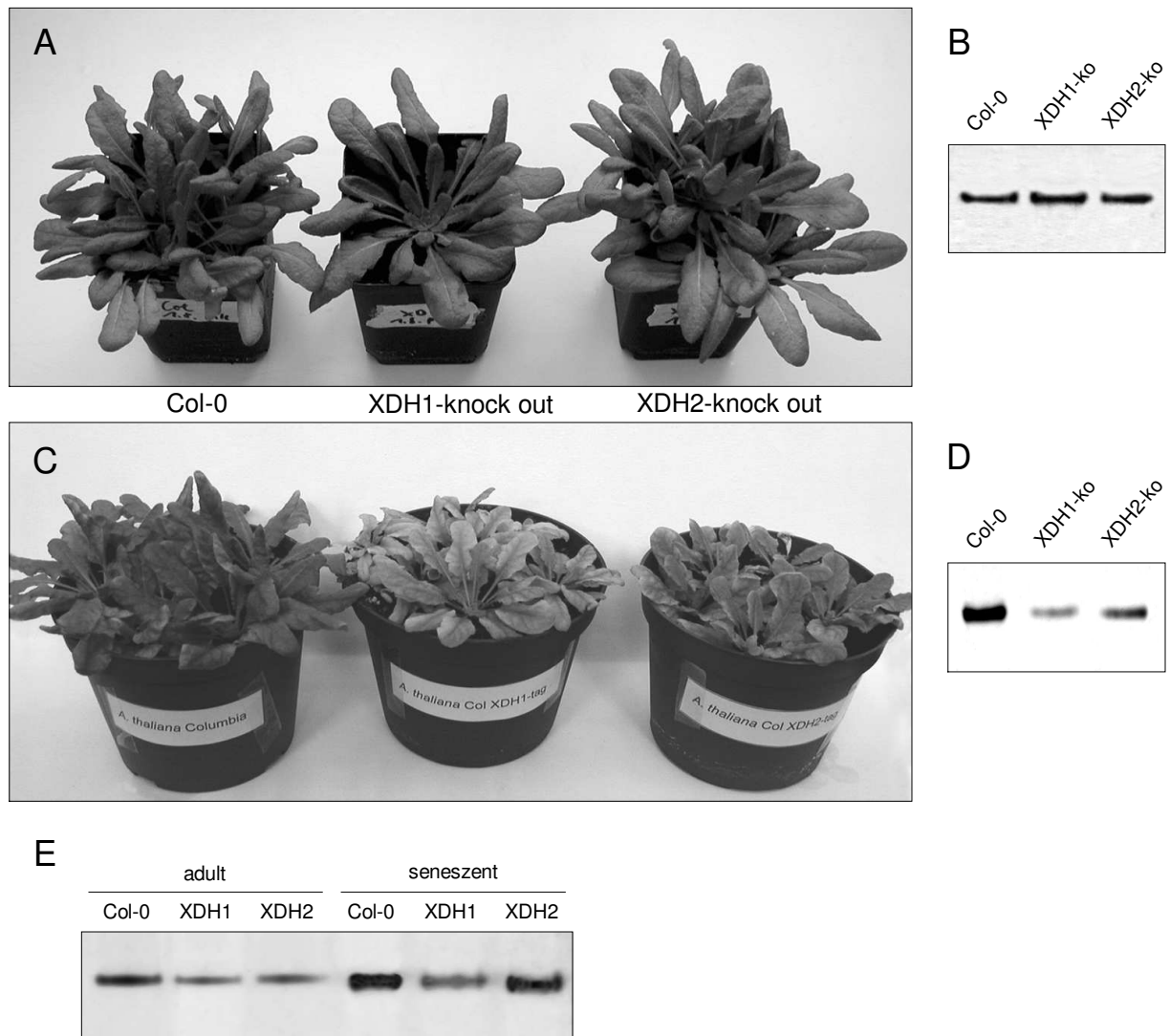


Abb. 2-9: AtXDH-„knock out“ Mutanten von *A. thaliana* im Vergleich mit dem korrespondierenden Wildtyp. (A) Habitus von vier Wochen alten, unter Standard-Bedingungen kultivierten Pflanzen. (B) XDH-Aktivität in Blattextrakten der Pflanzen aus (A). (C) Habitus von sieben Wochen alten Pflanzen, deren Generationsdauer sich auf Grund von veränderten Lichtbedingungen verlängert hatte. Die entsprechenden XDH-Aktivitäten sind in (D) abgebildet. (E) Vergleich der XDH-Aktivität in Extrakten von seneszenten Blättern und Folgeblättern. (B, D, E) Nach Auftrennung von jeweils 90µg Blatt-Rohextrakt im nativen 7,5% PA-Gel wurde die XDH-Aktivität mit Hypoxanthin als Substrat nachgewiesen (XDH1 = AtXDH1-ko; XDH2 = AtXDH2-ko).

2.4 Subzelluläre Lokalisierung der AtXDH1

Über die subzelluläre Lokalisierung pflanzlicher XOR-Proteine sind bisher keine eindeutigen Daten verfügbar. Deshalb sollte die Lokalisierung der AtXDH1 in der Zelle einerseits mit Hilfe von GFP- („green fluorescent protein“)-Fusionsproteinen untersucht werden. Zusätzlich wurde eine *in silico*-Analyse der Proteinsequenz mit dem Programm IPSORT durchgeführt (<http://psort.nibb.ac.jp>), welches eine Transmembranregion im Bereich der Aminosäuren 681-697 vorhersagte. Dieser Bereich befindet sich innerhalb der Moco-Dimerisierungs-

Domäne, wobei der anschließende C-terminale Rest des Proteins von 665 Aminosäuren als der putativ cytoplasmatische Schwanz bezeichnet wurde. IPSORT berechnete außerdem die folgenden Wahrscheinlichkeiten für mögliche Lokalisierungen der AtXDH1:

Plasmamembran	0,700
Nucleus	0,600
Peroxisomen	0,396
Endopl. Reticulum	0,200

Anhand dieser Berechnungen gibt es keine eindeutige Präferenz für ein bestimmtes Zell-Kompartiment im Hinblick auf die AtXDH1-Lokalisierung.

2.4.1 GFP-AtXDH1 Fusionsproteine

Für die Untersuchung der Lokalisierung wurden zwei verschiedene Konstrukte hergestellt, bei denen die *AtXDH1* cDNA einerseits an den C-Terminus, andererseits an den N-Terminus des GFP fusioniert wurde. In beiden Fällen wurde vor dem Start-ATG der *AtXDH1* cDNA sowie vor dem Stop-Kodon für die C-terminale GFP-Fusion bzw. nach dem Stop-Kodon für die N-terminale GFP-Fusion eine *Bam*HI Schnittstelle eingefügt. Anschließend wurden die modifizierten cDNAs ungerichtet in die Vektoren pBS GFP C-Fus und pBS GFP N-Fus (Nowak, 2004) kloniert, in denen sich die Fusionsproteine unter Kontrolle eines zweifach verstärkten 35S CaMV-Promotors befinden (Abb. 2-10).

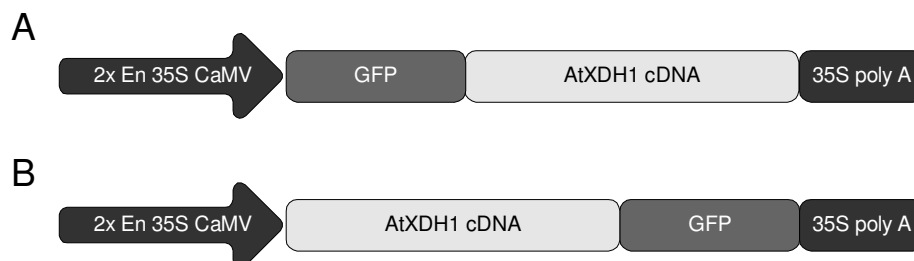


Abb. 2-10: Expressionskassetten der AtXDH1-GFP Fusionsproteine.

Die verwendeten Vektoren sind (A) pBS GFP C-Fus und (B) pBS GFP N-Fus (Nowak, 2004).

Nach dem Überprüfen der Konstrukte durch beidseitiges Ansequenzieren wurden diese für die transiente Transformation von Tabak-Blättern (*N. tabacum*) mittels Partikelkanone verwendet. Ein bis zwei Tage nach dem Beschuss der Blätter wurden diese mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes auf die Expression des GFP hin untersucht. In mehreren unabhängigen Ansätzen konnte dabei keine GFP-Expression festgestellt werden. Infolgedessen war eine Untersuchung der subzellulären Lokalisierung der AtXDH1 mit transient transformierten Pflanzen nicht möglich.

2.4.2 Peroxisomenisolation

Da einerseits eine peroxisomale Lokalisierung für pflanzliche XOR-Proteine beschrieben ist (Sandalio *et al.*, 1988), andererseits die Untersuchung mittels GFP-Fusionsproteinen keine Ergebnisse brachte, wurden Peroxisomen aus Tabak-Blättern (*N. tabacum*) isoliert und darin die XDH-Aktivität bestimmt. Im Vergleich zum Tabak-Rohextrakt sowie zu unbehandelten Peroxisomen zeigten mittels Ultraschall aufgeschlossene Peroxisomen eine deutliche XDH-Aktivität im nativen PA-Gel (Abb. 2-11). Die Abbildung beruht auf einem Einzelexperiment und bedarf der Verifizierung durch Wiederholung; dennoch ist dies ein Hinweis auf eine mögliche peroxisomale Lokalisierung der AtXDH1.

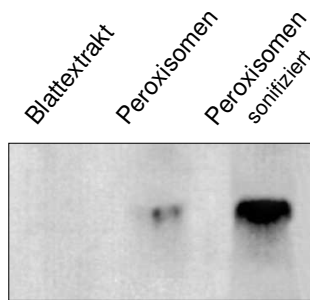


Abb. 2-11: Bestimmung der XDH-Aktivität in aufgereinigten Peroxisomen.

Im nativen 7,5% PA-Gel wurden 80 µg *N. tabacum* Blatt-Rohextrakt sowie jeweils 20 µl unbehandelte bzw. für 15 s sonifizierte Peroxisomen aufgetrennt und anschließend eine Aktivitätsfärbung mit Hypoxanthin als Substrat durchgeführt. Die aufgetragenen Peroxisomen entsprechen jeweils $\frac{1}{5}$ der aus 100 g *N. tabacum* Blättern isolierten Gesamtmenge.

2.5 Heterologe Expression und Aufreinigung der AtXDH1

Die angestrebte biochemische Charakterisierung der AtXDH1 erforderte zunächst die rekombinante Überexpression des Proteins. Einerseits bot sich als prokaryotisches Standard-Expressionssystem die Expression in *E. coli* an. Zum anderen wurde parallel dazu die Expression in eukaryotischen Systemen vorbereitet. Neben mono- und dikotylen Pflanzen erschien die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* besonders gut geeignet, da AAO1 und AAO2 aus *A. thaliana* bereits erfolgreich in diesem eukaryotischen System exprimiert werden konnten (Koiwai *et al.*, 2000). Da beide aus *P. pastoris* aufgereinigten AO-Proteine aktiv sind, war davon auszugehen, dass von *P. pastoris* auch an der nahe verwandten AtXDH1 die erforderlichen posttranslationalen Modifikationen vorgenommen werden können.

2.5.1 Klonierung und Expression der AtXDH1 in *E. coli*

Für die Expression in *E. coli* wurde der Vektor pTrcHis gewählt, der das zu exprimierende Protein mit einem N-terminalen His-Tag versieht. Die *AtXDH1* cDNA wurde direkt vor dem Start-ATG mit einer *NheI*-Schnittstelle und nach dem Stop-Kodon mit einer *BamHI*-Schnittstelle versehen und gerichtet in den Vektor kloniert. Das hergestellte Konstrukt wurde durch beidseitiges Sequenzieren überprüft und in den *E. coli*-Stamm TP1000 transformiert.

Zur Optimierung der AtXDH1-Expression wurden unterschiedliche Expressionsbedingungen getestet: Bei Temperaturen von 22°C, 30°C und 37°C wurden die Kulturen bei einer OD₆₀₀ von 0,5 oder 1,0 mit 0,02 mM IPTG bzw. 0,1 mM IPTG induziert. Nach 4, 8, 12 und 24 Stunden wurden Proben entnommen und ein Proteinrohextrakt hergestellt. Es konnte weder in Western-Analysen mit einem His-Tag Antikörper XDH-Protein detektiert werden, noch zeigte sich XDH-Aktivität im nativen Gel. Unter den getesteten Bedingungen wurde kein lösliches Protein in *E. coli* exprimiert, und die weiteren Bemühungen, rekombinante XDH zu erhalten konzentrierten sich auf eukaryotische Expressionssysteme.

2.5.2 Expression in pflanzlichen Systemen

Neben der Expression in *P. pastoris* wurden Suspensionskulturen von *Z. mays* cv. „Black Mexican Sweet“ sowie Tabakpflanzen *N. tabacum* cv. „Gatersleben“ als möglichst homologe Expressionssysteme getestet. Das Ziel war in beiden Fällen die Erzeugung stabiler Transformanten mit AtXDH1 unter Kontrolle des starken und konstitutiven 35S CaMV Promotors (Gardner *et al.*, 1981; Covey *et al.*, 1981). Ein N-terminaler His-Tag sollte der affinitätschromatographischen Aufreinigung des AtXDH1 Proteins dienen.

Expressionskonstrukte und Transformation der Pflanzen

Die verwendete Promotorkassette setzte sich aus dem 35S CaMV-Promotor mit dupliziertem Transkriptionsverstärker („Enhancer“), einem Tabakätz-Virus (tobacco etch virus) Translationsverstärker sowie dem 35S CaMV Polyadenylierungs-Signal zusammen und stammte aus dem Vektor pCK GFP (Reichel *et al.*, 1996). Die AtXDH1 cDNA wurde über *NcoI* und *BamHI*-Schnittstellen inklusive des N-terminalen His-Tag aus dem *E. coli*-Expressionsvektor pTrcHis ausgeschnitten und gegen die GFP cDNA in pCK ausgetauscht. Die gesamte Expressionskassette (s. Abb. 2-12) wurde über *HindIII*-Restriktionsschnittstellen ungerichtet in die Vektoren pRT99 und pBIN19 kloniert. Beide Konstrukte wurden durch beidseitiges Sequenzieren vor der weiteren Verwendung überprüft.

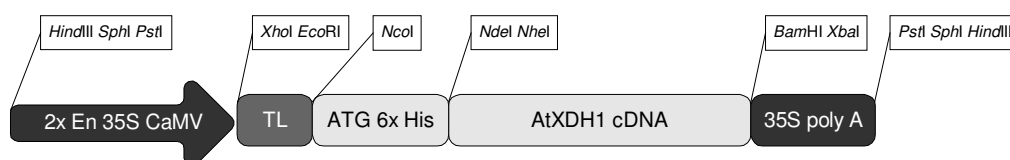


Abb. 2-12: Karte der AtXDH1 Expressionskassette.

TL = Tabakätz-Virus Translationsverstärker; 35S polyA = 35S CaMV Polyadenylierungs-Signal.

Die Transformation der *Z. mays* Suspensionskulturen mit dem Konstrukt pRT99 2x 35S::His AtXDH1 erfolgte über direkten Gentransfer mittels Partikel-Kanone wie in 4.6.4 beschrieben. Das Binärvektor-Konstrukt pBIN19 2x 35S::His AtXDH1 diente der *A. tumefaciens*-vermittelten Blattscheibentransformation von *N. tabacum* nach Horsch *et al.* (1985).

Untersuchung putativer Transformanten

Die transformierten Suspensionskulturen bildeten Kanamycin-resistente Kalli, von denen 23 unabhängige Linien auf Fremdgenexpression hin untersucht wurden. Proteinrohextrakte wurden einer Western-Analyse mittels His-Tag Antikörper unterzogen sowie im nativen PA-Gel auf XDH-Aktivität getestet. Keine der untersuchten Linien zeigte eine stärkere XDH-Aktivität als der zum Vergleich aufgetragene *Z. mays* Kallus-Wildtyp (Abb. 2-13). Auch der His-Tag Antikörper reagierte lediglich mit der rekombinanten XDH aus *P. pastoris*. Die Expression rekombinanter AtXDH1 in *Z. mays* Suspensionskulturen war demnach nicht möglich.

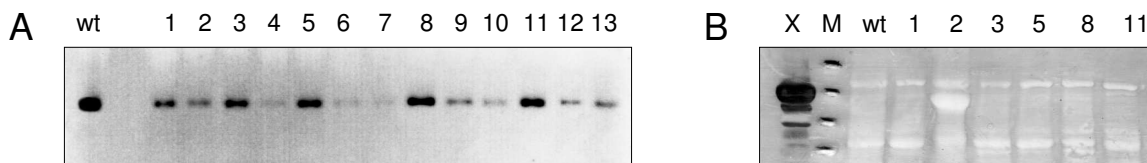


Abb. 2-13: Analyse Kanamycin-resistenter *Z. mays* Kallus-Linien.

Je 45 µg Protein-Rohextrakt wurden im nativen Aktivitätsgel mit Hypoxanthin als Substrat **(A)** bzw. im Westernblot mit His-Tag Antikörper **(B)** untersucht (wt = *Z. mays* Kallus-Wildtyp; X = 15 µg rekombinante XDH aus *P. pastoris*; M = Marker, Bandengrößen von oben nach unten: 200 kDa, 150 kDa, 120 kDa, 100 kDa).

Aus den *N. tabacum*-Blattscheiben regenerierten nach der Transformation Kanamycin-resistente Pflanzen, von denen 39 im XDH-Aktivitätsgel untersucht wurden. Von diesen 39 unabhängigen Linien wiesen 16 eine dem Wildtyp gegenüber stark erhöhte XDH-Aktivität auf. In Abb. 2-14A sind die XDH-Aktivitäten von 26 untersuchten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. Von 5 Pflanzen mit erhöhter XDH-Aktivität wurde aus jeweils 1 g Blattmaterial ein Rohextrakt mit Ni-NTA-Lysis-Puffer hergestellt und die rekombinante AtXDH1 mittels Ni-NTA aufgereinigt. Die ersten beiden Eluatfraktionen wurden jeweils im Coomassiegefärbten denaturierenden PA-Gel und im nativen XDH-Aktivitätsgel analysiert (Abb. 2-14B u. C). Während bei allen fünf Transformanten sowohl Aktivität als auch eine Proteinbande von 150 kDa nachgewiesen wurden, konnte aus der gleichbehandelten Wildtyp-Kontrollpflanze kein Protein aufgereinigt werden. Folglich exprimierten diese Transformanten aktives AtXDH1-Protein, das sich durch den His-tag mittels Ni-NTA Matrix aufreinigen ließ.

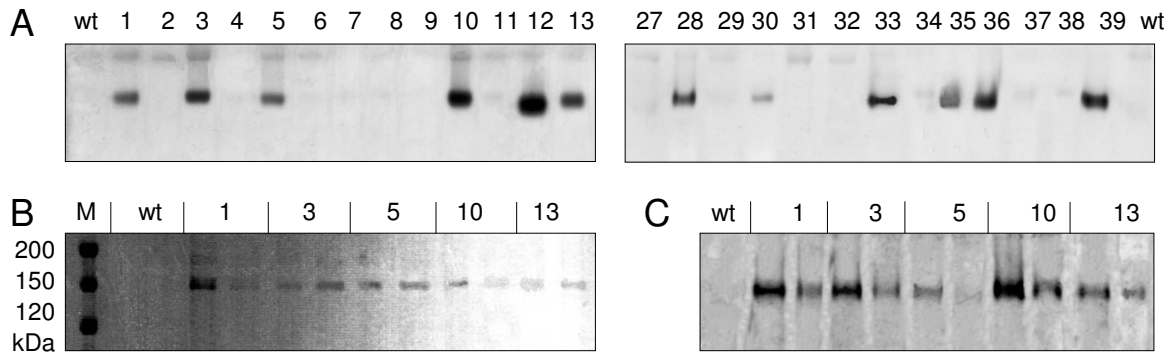


Abb. 2-14: Überexpression der AtXDH1 in *N. tabacum*.

(A) Bestimmung der XDH-Aktivität in je 30 µg Rohextrakt der angegebenen Linien im nativen 7,5% PA-Gel mit Hypoxanthin als Substrat. Je 15 µl Ni-NTA gereinigte Eluatfraktionen wurden im Coomassie-gefärbten 7,5% PA-Gel (B) und im nativen Aktivitätsgel mit Hypoxanthin als Substrat (C) untersucht. (wt = *N. tabacum* Wildtyp; M = Marker).

2.5.3 Klonierung und Transformation in *P. pastoris*

Für die Expression der AtXDH1 in *P. pastoris* wurde der „EasySelect *Pichia* expression kit“ von Invitrogen genutzt. Der AtXDH1 cDNA wurde eine *KpnI*- und eine *Apal*-Schnittstelle vor dem Start- bzw. direkt vor dem Stop-Kodon eingefügt und die cDNA anschließend in den Vektor pPICZA mit C-terminalem His-Tag kloniert. Nach Sequenzierung wurde das Konstrukt mittels Elektroporation in den *P. pastoris*-Stamm KM71 transformiert.

Vier Zeocin-resistente Klone wurden zum einen mittels PCR auf die Integration des Fremdgens hin überprüft sowie im Hinblick auf AtXDH1-Expression getestet. Nach 16 h Wachstum und weiteren 10 h Induktion wurden die Kulturen geerntet und Proteinrohextrakte im nativen XDH-Aktivitätsgel getestet. Der Klon Nr. 3 zeigte nicht nur die höchste XDH-Aktivität, sondern es konnte auch die AtXDH1 cDNA in der analytischen PCR identifiziert werden. Diese Hefe-Linie wurde daraufhin für die Expression der AtXDH1 verwendet.

2.5.4 Expression der AtXDH1 in *P. pastoris* in Schüttelkolben

Die Expression in *P. pastoris* gliedert sich in zwei Phasen. Das Wachstum auf Medium mit Glycerin als einziger Kohlenstoff-Quelle liefert zunächst die erforderliche Biomasse. Anschließend wird das Medium gewechselt. Als neue Kohlenstoff-Quelle induziert Methanol zugleich die Fremdgenexpression.

Generell erfolgte die Expression bei 30°C in Schikanekolben bei hohen Schütteldrehzahlen, um den erforderlichen hohen Sauerstoffeintrag ins Medium zu gewährleisten. Eine Expressionskinetik diente der Optimierung weiterer Parameter. Neben den Komplexmedien BMGY und BMMY wurden die Minimalmedien MGYH und MMYH (Invitrogen) für Wachstum und

Induktion der Hefen getestet. In beiden Fällen wurden die Kulturen bei einer $OD_{600} = 2-3$ nach 17 h Wachstum durch Mediumwechsel auf BMMY bzw. MMYH mit 0,5% Methanol und 0,3 mM Na-Molybdat induziert. Direkt nach der Induktion sowie zu weiteren definierten Zeitpunkten wurde jeweils 1 ml Kultur geerntet und im nativen XDH-Aktivitätsgel bzw. im Western-Blot mit einem His-Tag Antikörper getestet. Die auf dem Komplexmedium kultivierten Hefen zeigten eine deutlich höhere XDH-Expression (Abb. 2-15) gegenüber den auf Minimalmedium gezogenen Zellen. Die höchste XDH-Aktivität ist 12 h nach der Induktion erkennbar. Dies korreliert mit der ebenfalls bei der 12 h-Probe detektierten stärksten Proteinbande in der Immunblot-Analyse. Daraufhin wurden die Zellen für 17-20 h auf BMGY angezogen, induziert und nach weiteren 12 h Kulturdauer geerntet.

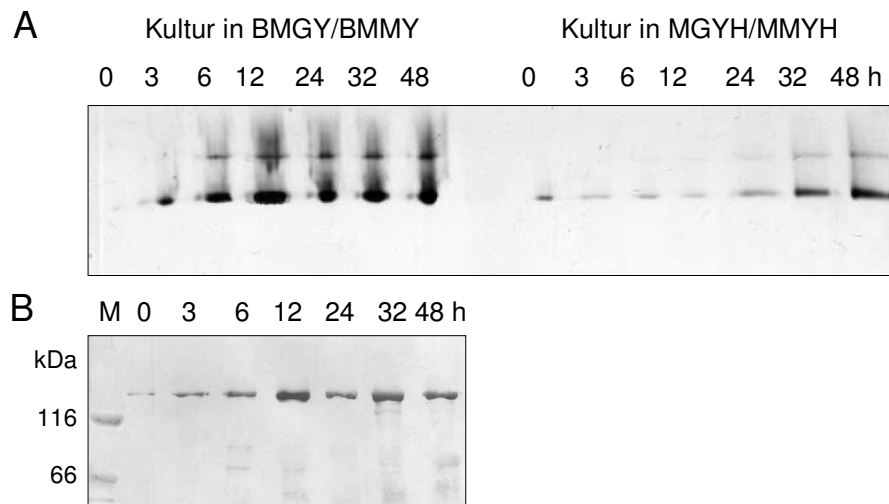


Abb. 2-15: Expressionskinetik von AtXDH1.

Je 15 μ l *P. pastoris*-Rohextrakt wurden im nativen Aktivitätsgel mit Hypoxanthin als Substrat (**A**) bzw. im Westernblot mit His-Tag Antikörper (**B**) untersucht. (M = Marker)

2.5.5 Fermentation von *P. pastoris*

P. pastoris bietet sich insbesondere für die Kultur in einem Fermenter an. Dessen Verwendung ermöglicht nicht nur größere Kulturvolumina, sondern erlaubt auch die Überwachung wichtiger Parameter, wie Sauerstoffgehalt und pH-Wert des Mediums. Nur unter derart definierten Bedingungen lassen sich hohe Zelldichten von bis zu 300 g/L und damit entsprechende Proteinausbeuten erzielen.

Wachstumskinetik und Medienoptimierung im Schüttelkolben

Im Vorfeld der eigentlichen Fermentation wurden Wachstumsraten und Biomasseerträge des XDH-Expressionsklones in verschiedenen Medien im Schüttelkolben bestimmt. Untersucht wurden BMGY sowie dessen vereinfachte Version YPG, außerdem das in „High Cell-

2. ERGEBNISSE

Densitiy Fermentation“ (Stratton *et al.*, 1998) vorgeschlagene Fermentationsmedium FM22. Nach dem Animpfen der Kolben wurde alle drei bis sechs Stunden Frisch- und Trockengewicht, die Wachstumsrate μ , die optische Dichte sowie der Glyzeringehalt des Mediums bestimmt. Wie in Abb. 2-16 ersichtlich, sind die Medien BMGY und YPG hinsichtlich des Wachstumsverhaltens von *P. pastoris* gleichwertig. Die maximale Zelldichte wurde nach 30 Stunden erreicht, während das Glycerin im Medium nahezu vollständig aufgebraucht war. In dem für die Fermentation gedachten Basalmedium FM22 wuchsen die Hefen dagegen nur sehr langsam, und der Glyzeringehalt im Medium wurde kaum verringert. Auch die Wachstumsrate und das maximal erzielte Frisch- und Trockengewicht blieben deutlich unter den in den Komplexmedien erreichten Werten (Tab. 2-3).

Tab. 2-3: Wachstum von *P. pastoris* im Schüttelkolben in verschiedenen Medien.

Es sind jeweils Mittelwerte aus sechs Messungen abgebildet (μ = Wachstumsrate; FW = Frischgewicht; TG = Trockengewicht).

Medium	μ_{\max} [h ⁻¹]	FW _{max} [g/L]	TG _{max} [g/L]
YPG	0,297	81,8 ± 2,1	19,9 ± 1,0
BMGY	0,302	84,1 ± 3,2	20,4 ± 1,8
FM22	0,122	29,3 ± 1,2	7,3 ± 0,6

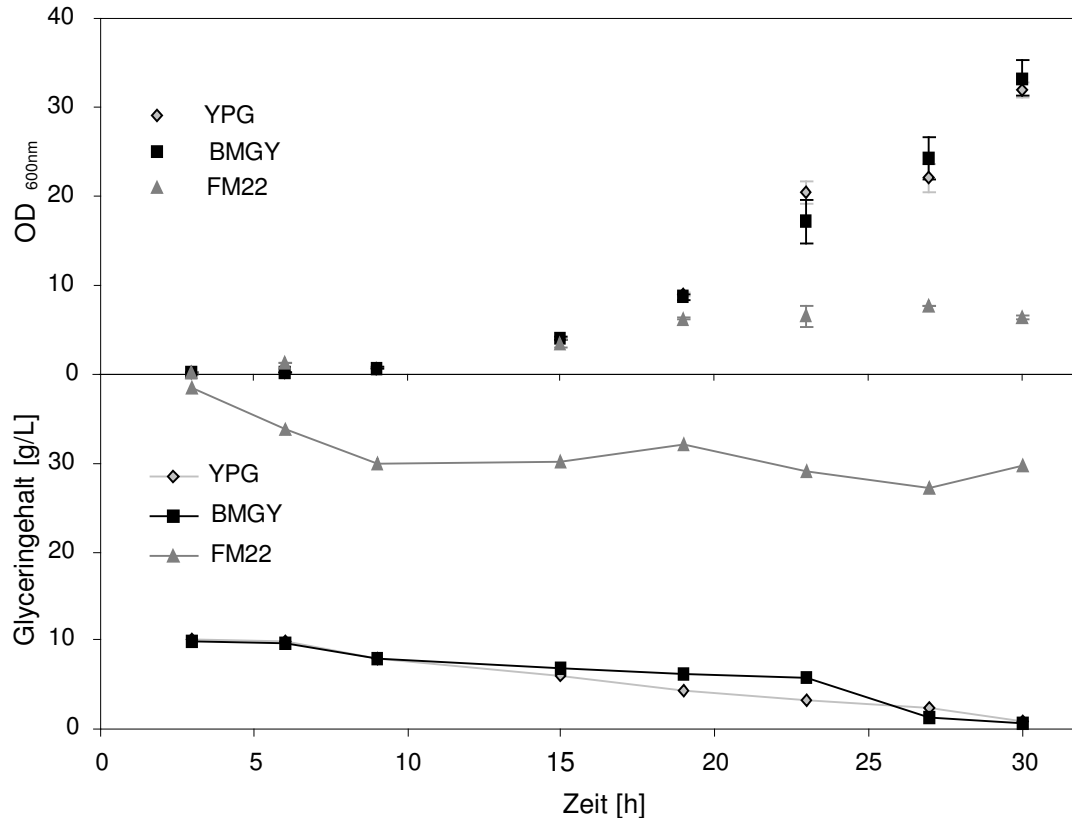


Abb. 2-16: Wachstum von *P. pastoris* in verschiedenen Medien im Schüttelkolben.

Alle Kolben wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ aus derselben Vorkultur 0,1%ig angeimpft. Die dargestellten Glyzeringehalte und optischen Dichten stellen Mittelwerte aus sechs Messungen dar.

Das Basalmedium eignete sich demnach nicht für die Fermentation. Statt des teuren und komplexen BMGY konnte jedoch das einfachere YPG verwendet werden.

Fermentationsansätze

Ähnlich wie im Schüttelkolben wird auch bei der Fermentation durch anfängliches Wachstum in Glycerin-haltigem Medium die Fremdgenexpression reprimiert und Biomasse generiert. Nach vollständigem Verbrauch des Glycerins wird Methanol zugeführt, welches nicht nur die Fremdgenexpression induziert, sondern auch als einzige Kohlenstoffquelle dient. Zwei verschiedene Ansätze zur Induktion der Fremdgenexpression sind möglich. Bei der üblichen Methode wird direkt nach Verbrauch des Glycerins die Methanolzufuhr gestartet, was dem in den „*Pichia* Fermentation Process Guidelines“ (Invitrogen) angegebenen Standardverfahren entspricht. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung so genannter „mixed feeds“, d.h. es werden gleichzeitig Glycerin und Methanol während der Induktionsphase zugeführt. Diese Methode wird erfolgreich eingesetzt bei Hefe-Stämmen wie dem verwendeten KM71 mit langsamer Methanolverwertung (Stratton *et al.*, 1998).

Beide Ansätze wurden im Rahmen dieser Arbeit in einem 10 L-Fermenter durchgeführt. In jedem Fall diente YPG mit 4% Glycerin als Fermentationsmedium, das mit 5% einer Vorkultur beimpft wurde. Den Verlauf einer Fermentation nach Standardverfahren zeigt Abb. 2-17. Innerhalb von 24 h wurde das gesamte Glycerin verbraucht, was unabhängig von der Glycerinbestimmung im Medium deutlich am Anstieg der Gelöstsauerstoff-Konzentration erkennbar war. In dieser Zeit wurde ein Frischgewicht von 106 g/L erreicht. In der nächsten Phase der Fermentation wurde die Methanolzufuhr mit 1 ml/L·h gestartet und nach 2 h alle 30 min um 10% erhöht. Mit dem Erreichen der maximalen Zufuhr rate von 3 ml/L·h nach 31,5 h stieg zugleich die Gelöstsauerstoff-Konzentration stark an, während das Frischgewicht sank. Nach 70 h wurde die Gelöstsauerstoff-Konzentration auf die für *P. pastoris* erwünschten 20% eingereguliert, um einen möglichen negativen Einfluss des hohen Sauerstoffgehalts auf die Hefen auszuschließen. Dennoch nahm das Frischgewicht der Kultur bis zur Ernte nach 92 h stetig ab.

Proteinrohextrakte aus den ab Induktionsbeginn genommenen Proben wurden affinitätschromatographisch mittels Ni-NTA Matrix aufgereinigt und die AtXDH1-Ausbeute im Coomassie-gefärbten SDS-Gel analysiert (Abb. 2-18). Über den ganzen Zeitraum ist in der Größe des AtXDH1-Monomers (entspricht 150 kDa) nur eine schwache Proteinbande zu erkennen, während insbesondere die 24-40 h-Werte viele Verunreinigungen aufweisen. Die beste AtXDH1-Ausbeute wurde nach 52-60 h Fermentation erzielt. Zu dieser Zeit betrug das Frischgewicht gleich bleibend 100 ± 2 g/L; die Gelöstsauerstoff-Konzentration lag bei 88-90%. Die Expression wurde demnach durch den hohen Sauerstoffgehalt im Medium nicht

2. ERGEBNISSE

negativ beeinflusst, während das Absenken des dO_2 -Wertes auf 20% nach 70 h die AtXDH1-Konzentration stark verringerte.

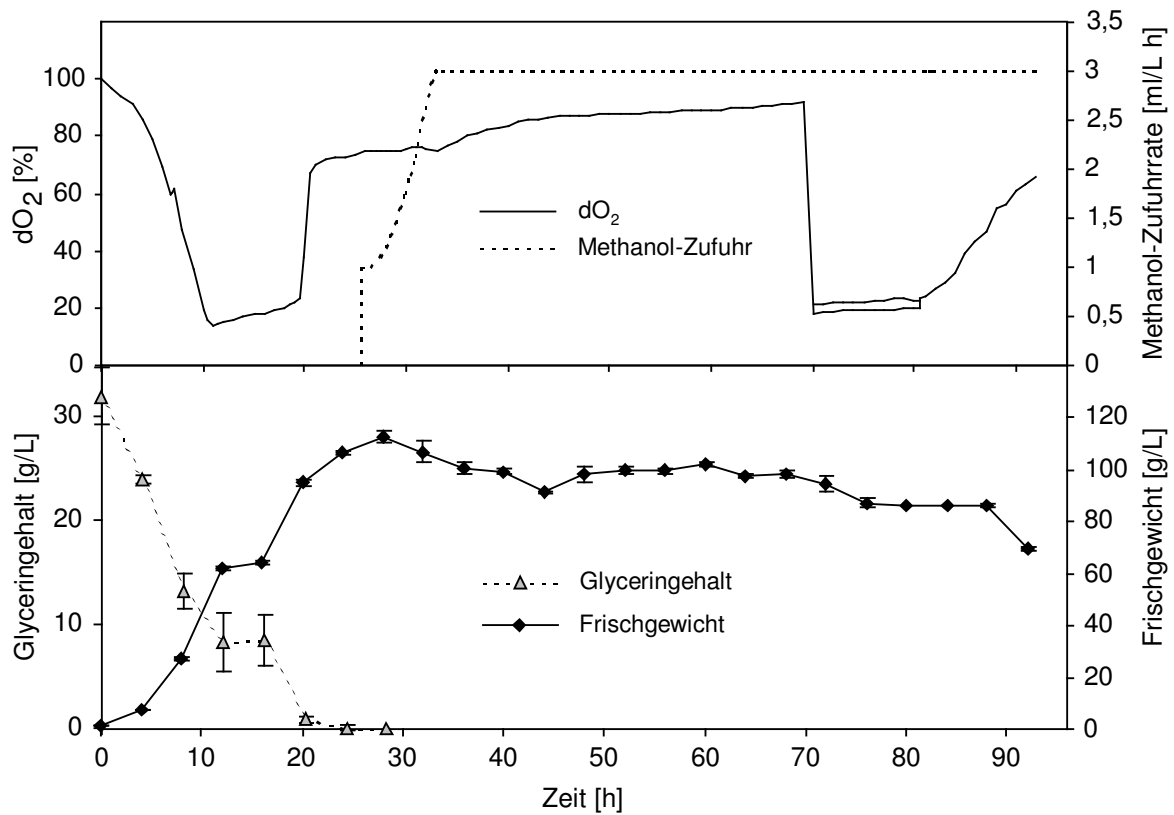


Abb. 2-17: Fermentation von *P. pastoris* nach Standardprotokoll (4.7.4).

Alle 4 h wurden Proben entnommen und das Frischgewicht sowie der Glyceringehalt im Medium bestimmt. Nach 70 h wurde die Gelöstsauerstoff-Konzentration (dO_2) durch automatisches Anpassen der Drehzahl auf ca. 20% einreguliert.

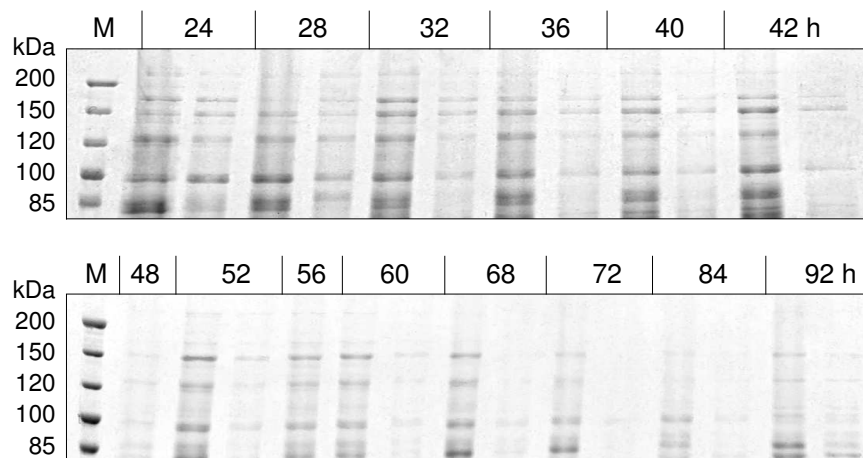


Abb. 2-18: Analyse der AtXDH1 Expression aus der in Abb. 2-17 gezeigten Fermentation.

Von jeder der untersuchten Proben wurden je 10 ml Proteinrohextrakt aus 25 ml Zellmaterial mit 500 μ l Ni-NTA aufgereinigt. Je 15 μ l der Eluatfraktionen 1 und 2 wurden im 7,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und Coomassie-gefärbt.

2. ERGEBNISSE

Die zweite durchgeführte Fermentation entsprach in der Anfangsphase dem Standardansatz, nach dem Verbrauch des Glycerins im Medium wurde jedoch das „mixed feed“-Verfahren zur Induktion der Fremdgenexpression angewandt. Abbildung 2-19 zeigt den Verlauf der Fermentation. Nach 27 h wurde mit der Glycerinzufuhr begonnen, nachdem das im Medium enthaltene Glycerin aufgebraucht worden war. Die Zufuhr rate des Glycerins wurde nach 2 h von 20 auf 10 ml/L·h verringert und weiter stündlich reduziert bis auf 5 ml/L·h, während gleichzeitig die Methanolzufuhr wie oben beschrieben gestartet und bis auf 3 ml/L·h erhöht wurde. Durch die Glycerinsupplementierung wurde ein im Vergleich zur ersten Fermentation deutlich höheres Frischgewicht von 128 g/L erreicht. Die Gelöstsauerstoff-Konzentration lag unregelmäßig bei ca. 30%, erst zum Ende der Fermentation stieg mit sinkendem Frischgewicht auch der Sauerstoffgehalt im Medium.

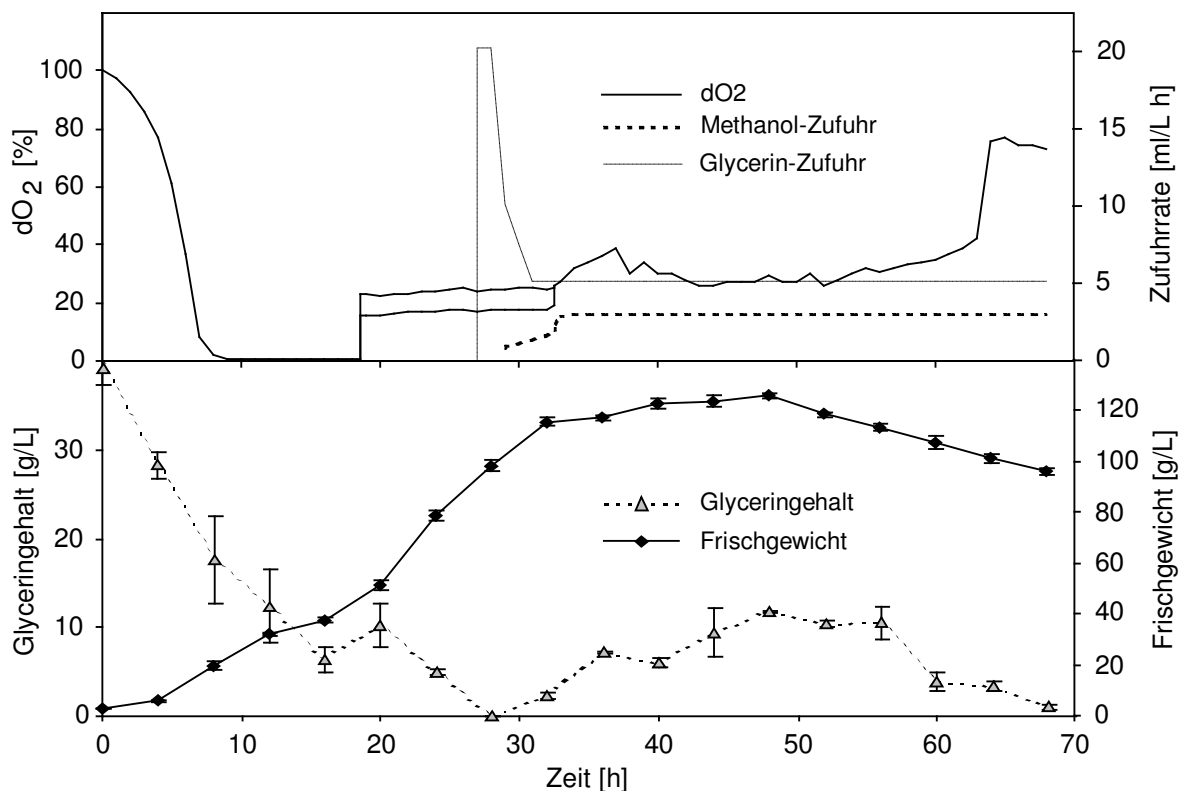


Abb. 2-19: Fermentation von *P. pastoris* mit gleichzeitiger Zufuhr von Glycerin und Methanol während der Induktionsphase.

Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde zwischen 18 h und 32 h auf 20% eingeregelt. Über den gesamten Zeitraum wurden alle 4 h Glyceringehalt und Frischgewicht bestimmt.

Auch bei dieser Fermentation wurden die Proben aufgearbeitet und eine Expressionsanalyse mittels Coomassie-gefärbtem PA-Gel durchgeführt (Abb. 2-20). Lediglich im 52 h- und 56 h-Wert sowie in der Endprobe nach 68 h ist eine schwache Bande bei 150 kDa zu erkennen. Stärkere Banden tauchen dagegen in der Höhe von ca. 80 kDa, 120 kDa und 170 kDa auf.

Das permanente Glycerinangebot während dieser Fermentation bewirkte zwar ein stärkeres Wachstum und damit eine höhere Biomassekonzentration der Hefe, verhinderte jedoch offensichtlich die Fremdgenexpression.

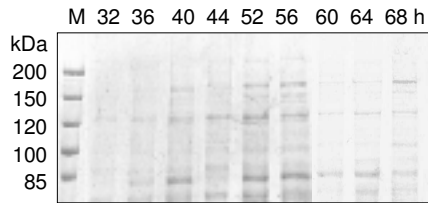


Abb. 2-20: Expressionsanalyse der in Abb. 2-19 gezeigten Fermentation.

Je 15 ml Proteinrohextrakt aus je 35 ml Zellmaterial pro Probe wurden mit 500 µl Ni-NTA aufgereinigt. Je 15 µl des Eluats wurden im 7,5%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und Coomassie-gefärbt.

Die Ernte beider Fermentationsansätze ergab jeweils ca. 1 L Zellmaterial, aus welchem die AtXDH1 wie unter 4.7.5 beschrieben aufgearbeitet wurde. Ein Vergleich der gereinigten Proteine aus beiden Fermentationen im Coomassie-gefärbten PA-Gel (Abb. 2-21) zeigt die Unterschiede in Proteinausbeute und Reinheit auf. Die Fermentation nach dem „mixed feed“-Verfahren führt zu vernachlässigbaren Proteinmengen und eignet sich nicht für die Expression der AtXDH1. Die Standardfermentation liefert relativ sauberes AtXDH1 Protein und bietet sich als Alternative zur Expression im Schüttelkolben an, wenn große Zell- und damit Proteinmengen erforderlich sind. Für die schnelle Erzeugung geringerer Proteinmengen bleibt der Schüttelkolben weiterhin das Mittel der Wahl, da der Aufwand im Verhältnis zum Ertrag wesentlich geringer ist.

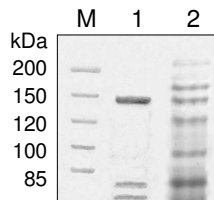


Abb. 2-21: Affinitätschromatographisch aufgereinigte AtXDH1 aus einer Standardfermentation (1) und einer „mixed feed“-Fermentation (2).

Je 10 µl Ni-NTA gereinigtes Protein wurden im 7,5%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und Coomassie gefärbt. (M = Marker)

2.5.6 Aufreinigung der AtXDH1 aus *P. pastoris*

Proteinrohextrakte aus *P. pastoris* wurden wie unter 4.7.5 beschrieben hergestellt – je nach Zellvolumen erfolgte der Zellaufschluss mittels Kugelmühle, French Press oder durch Vortexen der mit Glasperlen versetzten Zellen. Aus dem Rohextrakt wurde die AtXDH1 affinitätschromatographisch über Ni-NTA Tropfsäulen wie unter 4.3.1 beschrieben aufgereinigt. Die Auftrennung der Eluatfraktionen im 7,5 %igen SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung zeigte zwei Hauptbanden bei 150 kDa und 80 kDa sowie eine Vielzahl weiterer Proteinbanden (s. Abb. 2-22A). Die obere Bande korrespondiert mit dem errechneten Molekulargewicht des AtXDH1 Monomers inklusive His-Tag von 150,2 kDa und wird auch in der Western-Analyse von einem His-Tag Antikörper erkannt. Die weiteren im Coomassie-

gefärbten Gel sichtbaren Proteine scheinen Verunreinigungen zu sein, die größtenteils unspezifisch an die Matrix binden und daher co-gereinigt wurden. Durch den Einsatz eines Waschpuffers mit 0,5% Triton X-100 konnten der Anteil der Proteinverunreinigungen verringert und dadurch die AtXDH1-Menge am Gesamtproteingehalt der Eluatfraktion gesteigert werden (Abb. 2-22B).

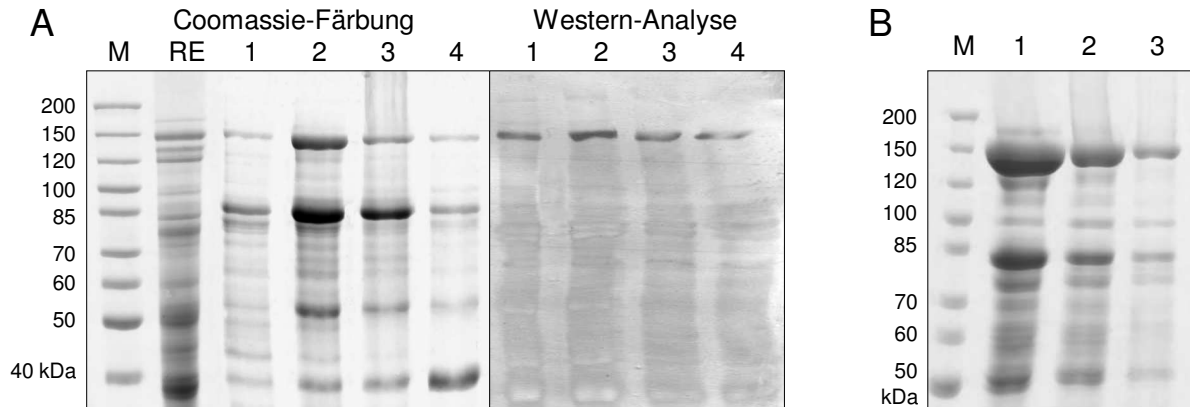


Abb. 2-22: AtXDH1-Fractionen nach Ni-NTA Aufreinigung.

(A) 5 µl Rohextrakt (RE) und je 15 µl der Eluatfraktionen im Coomassie-gefärbten 7,5% SDS-Gel bzw. je 10 µl pro Fraktion in der Western-Analyse mit His-Tag Antikörper. (B) Ni-NTA Aufreinigung mit Waschpuffer inklusive 0,5% Triton X-100. Je 5 µl AtXDH1-Fractionen im Coomassie-gefärbten 7,5% SDS-Gel. (M = Marker)

Anionenaustauscher-Chromatographie

Für die weitere Aufreinigung der AtXDH1 wurden die entsprechenden Fraktionen in Centriprep-Konzentratoren mit 50 kDa Ausschlussvolumen auf 2,5 ml ankonzentriert und mit einer Sephadex G-25 PD10-Säule in 50 ml Tris/HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 2 mM DTT entsalzt. Die Proteine wurden auf eine im gleichen Puffer äquilibrierte Source15Q-Säule geladen und in einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Ein Aliquot des Proteins vor der Anionenaustauscher-Reinigung, eine Durchbruch-Fraktion sowie die Fraktionen, die den drei Absorptionsmaxima („peaks“) bei 280 nm entsprechen, wurden im 7,5% SDS-Gel kontrolliert.

Die Abbildung 2-23 zeigt, dass die AtXDH1 bei einer Salzkonzentration von 150-200 mM NaCl von der Säule eluiert, während sich der Hauptteil der Verunreinigungen im Durchbruch befindet. Die Fraktionen 13-18 wurden vereinigt, ankonzentriert und für die biochemische Charakterisierung der AtXHD1 verwendet.

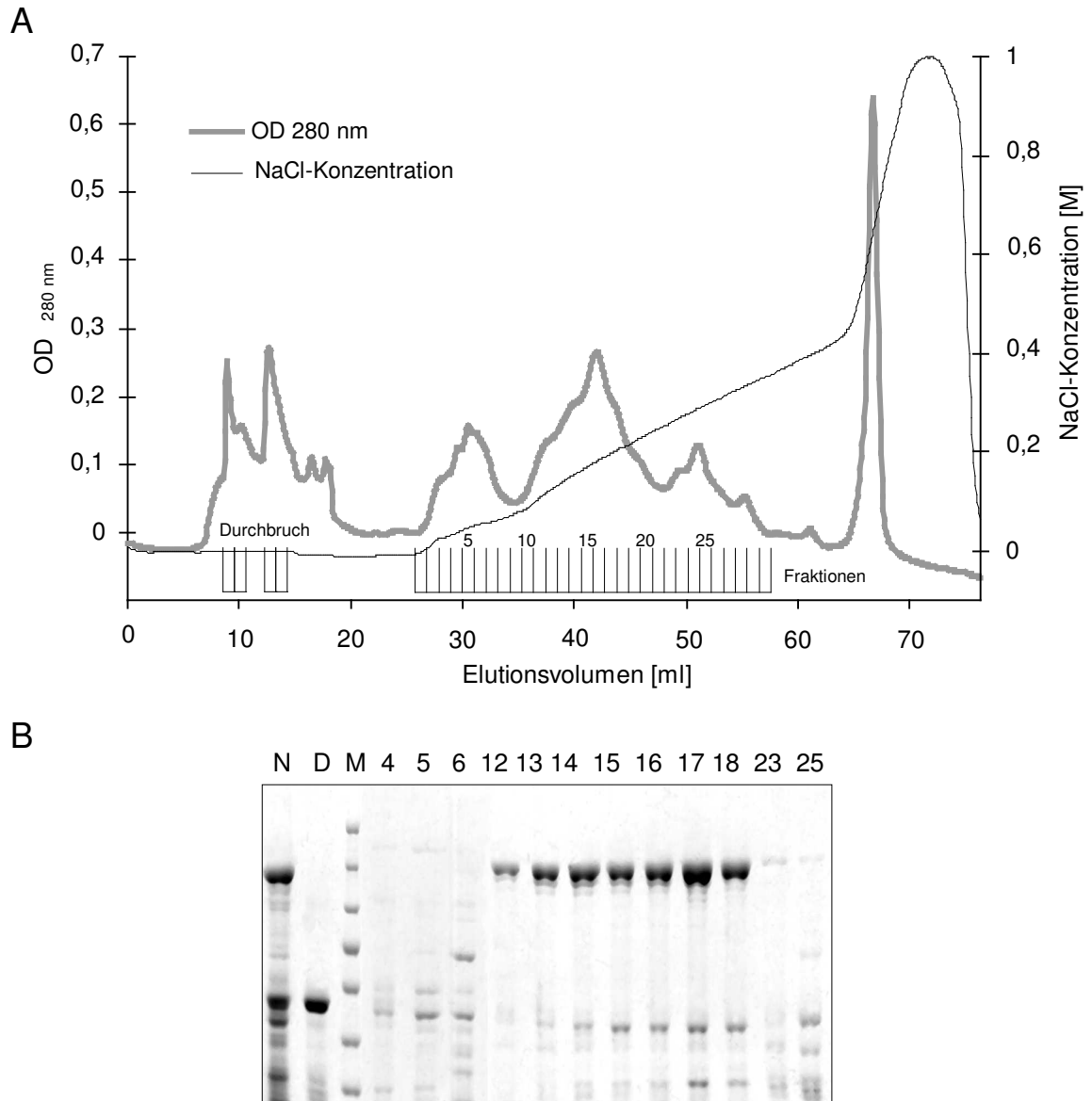


Abb. 2-23: Anionenaustauscher-Chromatographie von AtXDH1.

(A) Das Chromatogramm zeigt die Absorption bei 280 nm sowie die elektrolytische Leitfähigkeit als Maß der Salzkonzentration. (B) 5 μ l Ni-NTA gereinigtes Protein (N) und je 15 μ l der angegebenen Fraktionen im Coomassie-gefärbten 7,5% SDS-PA-Gel (D = Durchbruch-Fraktion; M = Marker, Bandengrößen von oben nach unten: 200 kDa, 150 kDa, 120 kDa, 100 kDa, 85 kDa, 70 kDa, 60 kDa).

2.6 Biochemische Charakterisierung der AtXDH1

Die für die biochemische Charakterisierung der AtXDH1 durchgeführten Versuche orientierten sich an den bisher für XOR-Proteine beschriebenen Analysen. Neben der Untersuchung des aus *P. pastoris* aufgereinigten rekombinanten Proteins brachte die Analyse der AtXDH1-Primärsequenz erste Anhaltspunkte hinsichtlich Funktion und Eigenschaften des Proteins.

2.6.1 Analyse der Proteinsequenz

Ein Sequenzvergleich zwischen AtXDH1 und AtXDH2 mit bekannten eukaryotischen XOR-Proteinen sowie den AO-Proteinen aus *A. thaliana* zeigte, dass sowohl AtXDH1 als auch AtXDH2 die typische Einteilung in eine N-terminale [Fe-S] Cluster-Bindungsdomäne, eine C-terminale Moco-Bindungsdomäne sowie eine dazwischen liegende FAD-Bindungsdomäne aufweisen. Das Alignment in Abbildung 2-24 verdeutlicht, dass beide Proteine innerhalb dieser Domänen (durch Rahmen gekennzeichnet) starke Homologien zu den Sequenzen der anderen eukaryotischen XORs zeigen. Die einzelnen Domänen sind durch Hinge-Regionen miteinander verbunden, die dagegen innerhalb der XOR-Proteine nur wenig konserviert sind.

Die [Fe-S] Cluster-Bindungsdomäne reicht von Aminosäure 19 bis 173 (AtXDH1) bzw. Aminosäure 11 bis 164 (AtXDH2) und enthält, wie für die XDH aus Hühnchen beschrieben (Amaya *et al.*, 1990), acht hochkonservierte Cysteine, die die Bindung zweier [2Fe-2S] Cluster ermöglichen. In der FAD-Bindungsdomäne (AS 260-440 in AtXDH1; AS 252-432 in AtXDH2) findet sich das Motiv FFLGYR, durch das der XDH-typische Elektronenakzeptor NAD⁺ über das konservierte Tyrosin gebunden wird (Nishino u. Nishino, 1989). Die dritte Domäne vermittelt zum einen die Dimerisierung zweier XDH-Monomere. Des Weiteren enthält sie die Moco- und Substrat-Bindungsstelle (Romao *et al.*, 1995) und überspannt Aminosäure 612-1272 in AtXDH1 bzw. AS 604-1264 in AtXDH2. Innerhalb der Moco Domäne aller XOR-Proteine befinden sich ein Glutamat und ein Arginin, die für die Bindung und die korrekte Positionierung von Purin-Substraten essentiell sind (Glatigny *et al.*, 1998). Auch AtXDH1 und AtXDH2 weisen diese Reste auf (E831 und R909 in AtXDH1; E832 und R901 in AtXDH2). Zusammen mit der NAD⁺ Bindungsstelle, die ebenso wie das Glutamat und Arginin bei AO-Proteinen fehlt (Ori *et al.*, 1997), ist dies ein Hinweis darauf, dass Purine die bevorzugten Substrate beider Proteine sind.

2. ERGEBNISSE

		[2Fe-2S]-Cluster Bindungsdomäne									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AtXDH1	93
AtXDH2	85
HsXDH	83
RnXDH	83
BtXDH	87
GgXDH	91
CeXDH	83
DmXDH	100
AtA01	82
AtA02	80
AtA03	100
consensus	
		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
AtXDH1	179
AtXDH2	171
HsXDH	166
RnXDH	165
BtXDH	166
GgXDH	175
CeXDH	177
DmXDH	167
AtA01	196
AtA02	172
AtA03	170
consensus	200
		Hinge-Region									
		210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
AtXDH1	261
AtXDH2	253
HsXDH	231
RnXDH	230
BtXDH	231
GgXDH	257
CeXDH	258
DmXDH	229
AtA01	251
AtA02	220
AtA03	224
consensus	300
		FAD-Bindungsdomäne									
		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
AtXDH1	356
AtXDH2	348
HsXDH	328
RnXDH	327
BtXDH	328
GgXDH	354
CeXDH	355
DmXDH	326
AtA01	341
AtA02	318
AtA03	314
consensus	400
		Hinge-Region									
		410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
AtXDH1	445
AtXDH2	437
HsXDH	417
RnXDH	416
BtXDH	417
GgXDH	443
CeXDH	445
DmXDH	419
AtA01	440
AtA02	411
AtA03	409
consensus	500
		Hinge-Region									
		510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
AtXDH1	540
AtXDH2	532
HsXDH	510
RnXDH	509
BtXDH	510
GgXDH	536
CeXDH	538
DmXDH	512
AtA01	535
AtA02	502
AtA03	507
consensus	600
		Hinge-Region									
		610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
AtXDH1	632
AtXDH2	624
HsXDH	608
RnXDH	607
BtXDH	607
GgXDH	636
CeXDH	629
DmXDH	609
AtA01	631
AtA02	588
AtA03	599
consensus	700
		Moco-Dimerisierungsdomäne									
		710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
AtXDH1	726
AtXDH2	718
HsXDH	701
RnXDH	700
BtXDH	700
GgXDH	729
CeXDH	722
DmXDH	705
AtA01	731
AtA02	688
AtA03	699
consensus	800

2. ERGEBNISSE



Abb. 2-24: Alignment eukaryotischer XOR- und AO-Proteine.

Beginn und Ende der drei Domänen sind durch horizontale Pfeile gekennzeichnet, außerdem die konservierten Cysteine der Fe-S-Cluster-Bindungsdomäne durch (★), die NAD⁺-Bindungsstelle durch (▼) sowie das für die Purinbindung essentielle Glutamin und Arginin durch (▼). Die GenBank Accession-Nr. der verwendeten Proteine sind: AtXDH1 (AY171562), AtXDH2 (AY518202), *H. sapiens* XDH (P47989), *R. norvegicus* XDH (P22985), *B. taurus* XDH (CAA58497), *G. gallus* XDH (P47990), *C. elegans* XDH (NP_502747), *D. melanogaster* XDH (S07245), *A. thaliana* AO1 (BAA28624), AO2 (BAA28625), AO3 (BAA82672).

2.6.2 Größenbestimmung mittels Gelfiltration

Die wie unter 2.5.6 beschrieben und nach Anionenaustauscher-Chromatographie erhaltenen Proteine wurden auf einer Superdex 200 Gelfiltrationssäule dem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Wie in Abb. 2-25A dargestellt, wurde ein dominantes OD_{280 nm} Absorptionsmaximum bei einem Elutionsvolumen von 11 ml detektiert. Nach der in 2.5.6 angegebenen Formel entspricht dies einem Molekulargewicht von ca. 280-300 kDa, d.h. die nativ aufgereinigte rekombinante AtXDH1 liegt wie für andere XOR-Proteine bekannt als Dimer vor. Die Analyse der korrespondierenden Fraktionen im SDS-PA Gel (Abb. 2-25B) zeigte jeweils eine Bande von 150 kDa, die dem AtXDH1 Monomer entspricht. Ein Aktivitätstest derselben Fraktionen im nativen PA-Gel belegte, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um aktive AtXDH1 handelt.

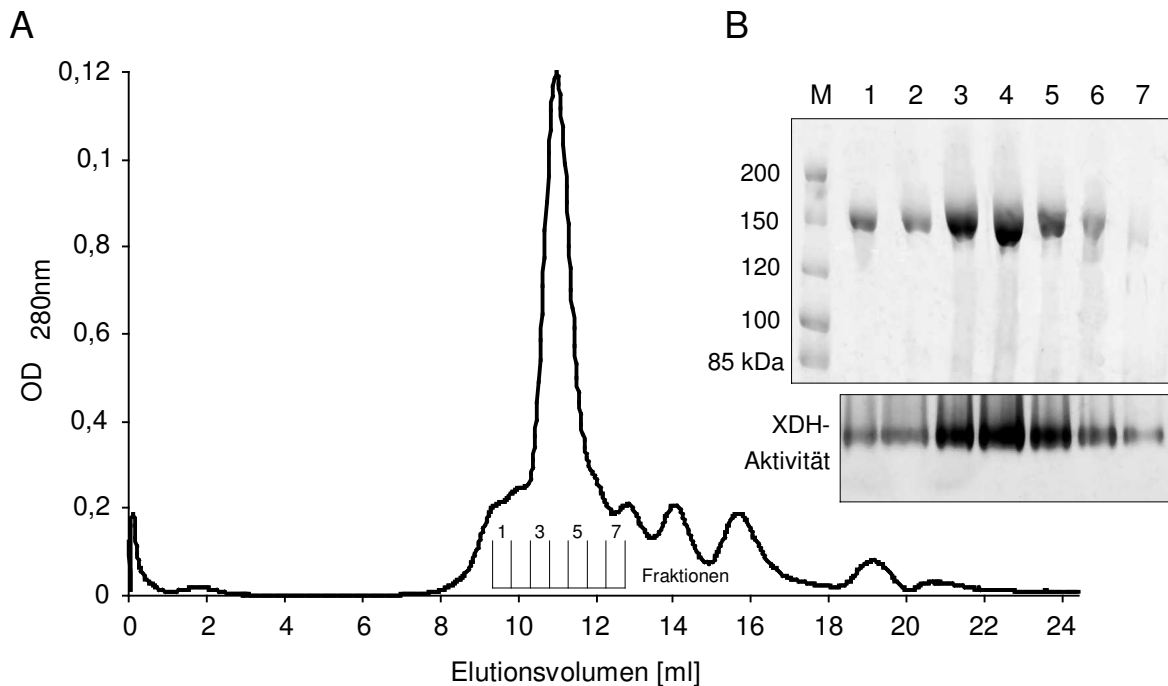


Abb. 2-25: Gelfiltration der AtXDH1.

(A) Chromatogramm der Gelfiltration an einer Superdex 200 HR 10/30 Säule. **(B)** Je 15 µl der angegebenen Fraktionen im Coomassie gefärbten 7,5 % SDS PA-Gel (*oben*) bzw. im nativen Aktivitätsgel mit Hypoxanthin als Substrat (*unten*), (M = Marker).

2.6.3 Absorptionsspektrum der AtXDH1

Das Absorptionsspektrum der AtXDH1 (Abb. 2-26) ist charakterisiert durch ein Maximum zwischen 454 und 458 nm sowie eine Schulter von 540 bis 590 nm und korreliert mit Spektren von anderen Mo enthaltenden Hydroxylasen. Ein Peak im Bereich von 450 nm ist charakteristisch für gebundene Flavin-Chromophore, während die Schulter bei 550 nm durch die

Absorption der [Fe-S] Zentren entsteht. Das Verhältnis beider Absorptionen von 2,8 ist nahe an dem für andere XDH-Proteine beschriebenen Verhältnis von 3 und steht für eine FAD:FeS Ratio von 1:4 (Coughlan, 1980; Mehra u. Coughlan, 1984). Die für die AtXHD1 typische Absorption zwischen 310 und 330 nm entsteht durch den gebundenen Moco, da Pterine in diesem Bereich absorbieren (Viscontini, 1971).

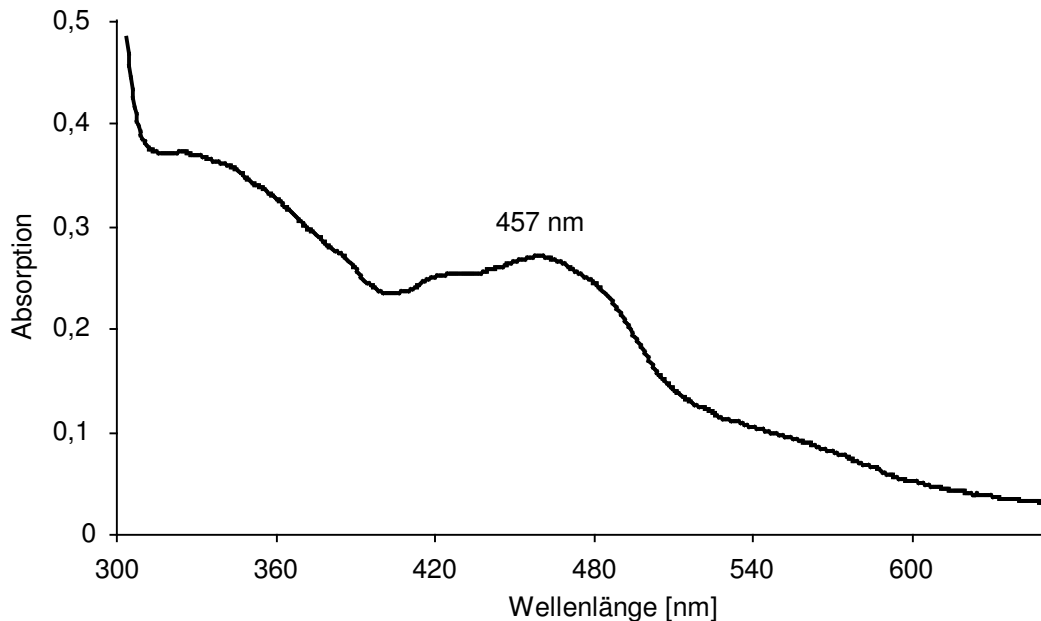


Abb. 2-26: Absorptionsspektrum der AtXDH1.

Vermessen wurde Ni-NTA gereinigtes Protein mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml in 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM EDTA.

2.6.4 Basale Aktivitätsuntersuchungen

Die Aktivität der rekombinanten XDH lässt sich einerseits im *in Gel*-Aktivitätsnachweis durch die Verwendung von MTT als Elektronenakzeptor nachweisen. Reduziertes MTT bildet einen unlöslichen Formazan-Farbstoff, der im nativen PA-Gel als blaue Bande sichtbar wird. Andererseits lässt sich bei Verwendung von NAD⁺ als Elektronenakzeptor das entstehende NADH photometrisch nachweisen und quantifizieren. Der Nachweis im nativen PA-Gel erlaubt den Vergleich von rekombinantem Enzym mit nativer XDH aus *A. thaliana* Blatt-Rohextrakt hinsichtlich ihres Laufverhaltens im Gel. Wie in Abb. 2-27 zu erkennen, zeigten die aufgereinigte AtXDH1 und die XDH im Pflanzenextrakt die gleiche Mobilität. Daraus kann geschlossen werden, dass *P. pastoris* an der rekombinanten AtXDH1 sämtliche *in vivo*-vorhandenen posttranslationalen Modifikationen durchführt. Dies ist zugleich ein Hinweis darauf, dass die rekombinante AtXDH1 die gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften wie die native XDH besitzt.

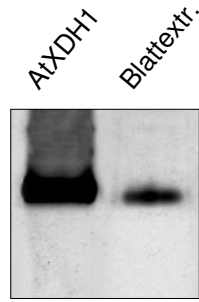


Abb. 2-27: Mobilität von nativer XDH aus einem *A. thaliana* Blatt-Rohextrakt und AtXDH1 im nativen Aktivitätsgel.

Auftrennung von 5 µg rekombinantem Enzym bzw. 50 µg Rohextrakt im 7,5% PA-Gel; Aktivitätsfärbung mit Hypoxanthin als Substrat.

Mit Hilfe des photometrischen Aktivitätsnachweises wurde das pH-Optimum der AtXDH1 bestimmt sowie der Einfluss verschiedener Lagerbedingungen auf die Enzymaktivität untersucht. Die AtXDH1 zeigte die höchste Aktivität bei pH 8,5 in 50 mM Tris/HCl Puffer (Tab. 2-4). Eine Aufbewahrung des aufgereinigten Enzyms führte grundsätzlich zu Aktivitätsverlust; wie Tabelle 2-5 zu entnehmen ist, ging die Aktivität insbesondere bei 4 °C und -20 °C stark zurück. Unter den getesteten Bedingungen zeigte das Enzym die höchste Stabilität bei -70 °C; diese Temperatur hat sich somit als zweckmäßige Lagertemperatur für die rekombinante AtXDH1 erwiesen.

Tab. 2-4: Bestimmung des pH-Optimums der AtXDH1.

Aktivitäten gemessen als NAD⁺ Reduktion bei 340 nm in 50 mM HEPES (pH 6,0-7,5) bzw. 50 mM Tris/HCl (pH 7,5-9,0). Es sind Mittelwerte aus vier Messungen dargestellt, jeweils bezogen auf 300 µg Protein.

pH-Wert	6,0	6,5	7,0	7,5	7,8	8,0	8,4	8,5	8,6	9,0
NADH [mol/min]	18,68 ± 0,92	27,04 ± 1,02	29,46 ± 1,37	30,00 ± 1,90	35,95 ± 0,89	41,76 ± 4,1	42,14 ± 0,17	45,54 ± 0,31	38,68 ± 0,80	37,15 ± 0,06
Aktivität [%]	41,0	59,4	64,7	65,9	79,0	91,7	92,5	100	85,0	81,6

Tab. 2-5: Stabilität der AtXDH1 bei verschiedenen Temperaturen.

Die Aktivität wurde als NAD⁺ Reduktion bei 340 nm nach 8 Tagen Lagerung gemessen; es sind Mittelwerte aus vier Messungen dargestellt.

Lagertemperatur [°C]	gebildetes NADH [mol/min]	Aktivität [%]
frisch aufgereinigt	84,67 ± 7,87	100
4	50,73 ± 2,22	59,9
-20	42,39 ± 1,22	50,1
-70	65,66 ± 4,82	77,5

2.6.5 Aktivierung durch die Moco-Sulfurase ABA3

Die XDH benötigt als Monooxo-Mo-Hydroxylase zur finalen Aktivierung eine Sulfurierung des Moco im aktiven Zentrum. Dieser Schritt wird in *A. thaliana* durch die Moco-Sulfurase ABA3 katalysiert. Obwohl die aus *P. pastoris* aufgereinigte AtXDH1 bereits aktiv ist, sollte durch die Zugabe von ABA3 getestet werden, ob eine weitere Aktivierung möglich ist. Wie in Abb. 2-28A zu sehen ist, führte die Coinkubation von AtXDH1 mit rekombinantem ABA3 in Gegenwart von 1 mM L-Cystein, dem Schwefelsubstrat von ABA3, zu einem Anstieg der XDH-Aktivität. Daraus kann gefolgert werden, dass die AtXDH1 von *P. pastoris* nicht vollständig sulfuriert wurde. Die oberhalb der XDH im Gel sichtbare Bande nach ABA3-Behandlung könnte auf die Bildung eines AtXDH1-ABA3-Komplexes hinweisen. Die *in vitro*-Sulfurierung durch ABA3 sollte erwartungsgemäß nicht nur die Aktivitätssteigerung partiell aktiver AtXDH1, sondern auch die Rekonstitution gänzlich inaktiver AtXDH1 erreichen. Daher wurde durch eine Kaliumcyanid Behandlung der AtXDH1 der terminale Schwefel-Ligand des Moco abgespalten und das Enzym dadurch inaktiviert. Nach einer anschließenden ABA3 Behandlung erreichte die AtXDH1 knapp 15% der ursprünglichen Aktivität (Abb. 2-28B). Dieser geringe Anteil der Rekonstitution deutet darauf hin, dass die KCN-Behandlung vermutlich zu weiteren Schädigungen des Enzyms geführt hat. Dessen ungeachtet konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Rekonstitution von Desulfo-AtXDH1 durch die Moco-Sulfurase ABA3 prinzipiell möglich ist.

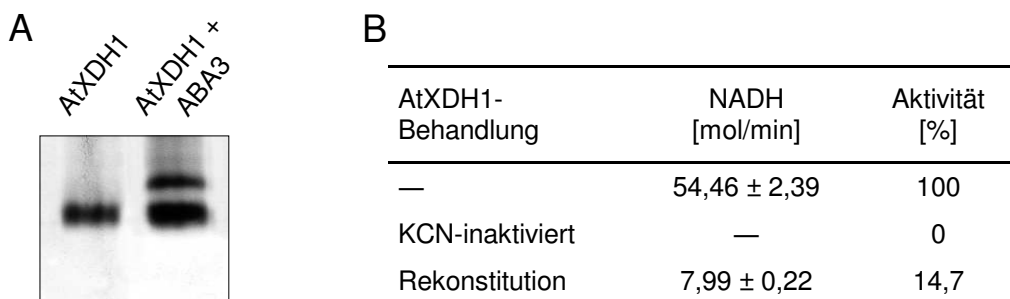


Abb. 2-28: Aktivierung und Rekonstitution der AtXDH1 durch ABA3.

(A) Je 4 µg AtXDH1 ohne und mit 8 µg ABA3 im nativen PA-Gel. Die Färbung erfolgte mit Hypoxanthin als Substrat. (B) Photometrische Aktivitätsbestimmung über NAD⁺-Reduktion bei 340 nm von je 60 µg unbehandelter, KCN-inaktivierter und mit 120 µg ABA3 reaktiverter AtXDH1.

2.6.6 Inhibitoren und Substratspezifität der AtXDH1

XOR-Enzyme katalysieren hauptsächlich die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure. Die AtXDH1 war außerdem in der Lage, Purin und verschiedene Aldehyde zu hydroxylieren (Tab. 2-6). Bezogen auf Hypoxanthin wurden die Aldehyde mit ei-

2. ERGEBNISSE

ner Rate zwischen 12,5% für Heptaldehyd und 31,1% für aromatische Aldehyde wie Indol-3-carbaldehyd umgesetzt. Die Aktivität der AtXDH1 wurde vollständig gehemmt durch den bekannten XOR-Inhibitor Allopurinol, der zu Alloxanthin umgesetzt, aber anschließend aus dem aktiven Zentrum nicht mehr freigegeben wird. Außerdem bewirkten *p*-Hydroxymercuribenzoat, ein Inhibitor von SH-Gruppen, sowie Kaliumcyanid, das wie oben angegeben den terminalen Schwefel-Liganden des Moco entfernt, einen vollständigen Aktivitätsverlust der AtXDH1.

Tab. 2-6: Substratspezifität der AtXDH1. Die Aktivität wurde als NAD⁺-Reduktion bei 340 nm gemessen. AtXDH1 und der angegebene Inhibitor wurden 5 min vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von Hypoxanthin gestartet wurde. Es sind Mittelwerte von drei Messungen dargestellt.

Substrat/Inhibitor	Konzentration [mM]	Bildung von NADH [mol/min]	Aktivität [%]
Hypoxanthin	1	43,07 ± 1,57	100
Xanthin	1	40,78 ± 0,75	94,7
Purin	1	4,44 ± 0,15	10,3
Indol-3-carbaldehyd	1	13,48 ± 0,87	31,3
Abscisinaldehyd	1	12,45 ± 1,47	28,9
Heptaldehyd	1	5,38 ± 1,66	12,5
1-Naphthaldehyd	1	11,83 ± 0,4	27,5
Allopurinol	0,1	—	0
<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat	0,1	—	0
Kaliumcyanid	50	—	0

Der Vergleich der Substratspezifität von AtXDH1 zu rekombinanter AAO α aus *A. thaliana* im nativen Aktivitätsgel offenbarte, dass die AtXDH1 wie schon gezeigt neben Xanthin und Hypoxanthin auch die getesteten Aldehyde als Substrate nutzen konnte (Abb. 2-29). Die AAO α hingegen war nicht in der Lage, Xanthin und Hypoxanthin zu hydroxylieren, konnte jedoch die Aldehyde weitaus effizienter umsetzen.

2. ERGEBNISSE

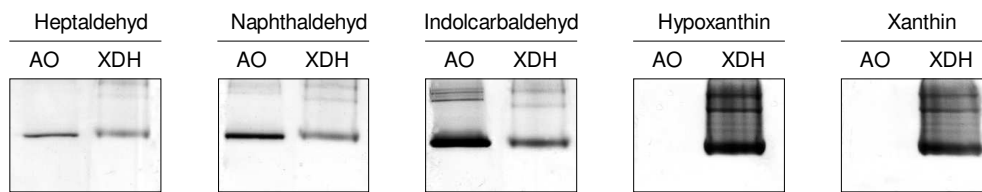


Abb. 2-29: Bevorzugte Substrate rekombinanter AtXDH1 und AAOα.

Je 10 µg AtXDH1 (XDH) bzw. AAOα (AO) wurden im nativen 7,5% PA-Gel aufgetrennt. Die Aktivitätsfärbung des in Streifen geschnittenen Gels erfolgte mit je 1 mM der angegebenen Substrate.

2.6.7 Untersuchung der NO-Produktion

Da die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die Rinder-XO beschrieben ist (Godber *et al.*, 2000), sollte untersucht werden, ob auch die AtXDH1 dazu in der Lage ist. Die Produktion von NO wurde mit Hilfe eines Chemilumineszenz-NO Analysers untersucht. Die für die Messungen eingesetzte rekombinante AtXDH1 wurde sorgfältig entsalzt, da in Vorversuchen festgestellt worden war, dass selbst geringste Mengen Imidazol oder DTT die NO-Bildung bzw. Detektion beeinträchtigen. Tabelle 2-7 gibt einen Überblick über die getesteten Bedingungen. Bei keinem der Versuchsansätze konnte eine NO-Produktion durch die AtXDH1 festgestellt werden. Nach Zugabe von Mais-Nitratreduktase wurde jedoch in jedem der Ansätze NO freigesetzt, so dass das Vorhandensein hemmender Substanzen im Versuchsansatz ausgeschlossen werden konnte. Es ist daher davon auszugehen, dass die AtXDH1 unter den getesteten Bedingungen kein Stickstoffmonoxid produziert.

Tab. 2-7: Untersuchung der NO-Produktion durch AtXDH1.

Jeder der Ansätze wurde mit 50 µg, 250 µg, 500 µg und 1 mg rekombinanter AtXDH1 durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurden 10 mU Mais-NR nach 15-30 min zu jedem Ansatz gegeben und die NO-Produktion beobachtet. Einsatzkonzentrationen: 0,2 mM NO_2^- ; 0,5 mM Xanthin; 0,5 mM NADH (x = im jeweiligen Ansatz enthaltene Komponente).

Ansatz Nr.	anaerob			aerob			NO- Produktion
	NO_2^-	Xanthin	NADH	NO_2^-	Xanthin	NADH	
1	x						—
2	x	x					—
3	x	x	x				—
4	x		x				—
5				x			—
6				x	x		—
7				x	x	x	—
8				x		x	—

2.6.8 Elektronenakzeptoren und Superoxidradikal-Bildung

Die XOR-Proteine liegen entweder in der Oxidase- oder in der Dehydrogenase-Form vor. Die AtXDH1 zeigte die höchste Umsatzrate mit NAD^+ als Elektronenakzeptor, während O_2 im Vergleich dazu lediglich eine Substrat-Hydroxylierung von 2,5% entwickelte (Tab. 2-8). Dies deutet darauf hin, dass die AtXDH1 ausschließlich als Dehydrogenase vorliegt. Bezogen auf die Reaktion mit O_2 wurde die O_2^- -Bildung durch die AtXDH1 als Superoxid-abhängige Reduktion von Cytochrom c gemessen. Von der Gesamtmenge der von Xanthin auf O_2 übertragenen Elektronen wurden 22% dieser Elektronen als Einzelelektron übertragen, d.h. die AtXDH1 bildete 22% Superoxidradikale.

Tab. 2-8: Verwendung von molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor und Bildung von Superoxidradikalen durch die AtXHD1.

Die Bildung von Harnsäure wurde spektrophotometrisch bei 295 nm, die Superoxid-abhängige Reduktion von Cytochrom c bei 550 nm jeweils mit Xanthin als Substrat gemessen.

Elektronen- akzeptor	Bildung von Harnsäure	Reduktion von Cytochrom c	Flux
	[mol/min]		[%]
NAD^+	35,541		
O_2	0,930	0,415	22

3 Diskussion

3.1 Die pflanzlichen Xanthindehydrogenasen AtXDH1 und AtXDH2 in *A. thaliana*

Das Genom von *A. thaliana* enthält zwei XOR-Gene, die anhand der Homologien auf cDNA- und Proteinebene zu bereits beschriebenen XOR-Sequenzen identifiziert wurden. Die Proteinsequenz der mit *AtXDH1* und *AtXDH2* bezeichneten Gene weist 47% bzw. 46% Identität zur Sequenz der Human- und der Rinder-XDH auf, jedoch lediglich 29-31% Identität zu den AO-Proteinen aus *A. thaliana*. Die Genprodukte von *AtXDH1* und *AtXDH2* repräsentieren demnach XOR-Proteine und keine AOs. Für beide Gene in *A. thaliana* konnten entsprechende cDNAs isoliert werden, die jeweils aus 14 Exons bestehen und für Proteine von 1361 Aminosäuren bei der *AtXDH1* bzw. 1353 Aminosäuren im Fall der *AtXDH2* codieren. Hinsichtlich der Exon/Intron-Struktur zeigen *AtXDH1* und *AtXDH2* im Vergleich mit XOR-Genen von Säugern und Insekten keine Gemeinsamkeit. Die Gene von Mensch und Maus enthalten jeweils 36 Exons (Xu *et al.*, 1996; Cazzaniga *et al.*, 1994) und zeigen untereinander eine stark konservierte Exon/Intron-Struktur, während das *D. melanogaster*- und das *C. vicina*-Gen lediglich aus vier bzw. fünf Exons besteht (Keith *et al.*, 1987; Houde *et al.*, 1989). Im Vergleich zu Säugetieren sind die Gene in *A. thaliana* generell kompakter aufgebaut und enthalten im Durchschnitt 5,2 Exons mit einer Länge von jeweils 250 bp (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Die Anzahl von 14 Exons in *AtXDH1* und *AtXDH2* ist damit vergleichsweise hoch, allerdings codieren beide Gene für besonders große Proteine mit über 1300 Aminosäuren.

3.1.1 Die mutmaßliche Duplikation des XDH-Locus in *A. thaliana*

Die Mehrzahl der bekannten Organismen besitzen jeweils ein einziges Gen, das für eine XOR codiert. Auch in den durchsequenzierten Genomen von Reis (*O. sativa*) und der einzelligen Grünalge *C. reinhardtii* existiert nur ein XOR-Gen, während das Genom von *A. thaliana* zwei für XDHs codierende Gene enthält. Diese insgesamt vier pflanzlichen Sequenzen bilden in der phylogenetischen Analyse von XOR-Proteinsequenzen eine eigene Untergruppe, die separat von Tieren und Pilzen gruppiert (vgl. Abb. 2-3). Die gesonderte und später auftretende Gruppierung beider *A. thaliana*-Gene innerhalb dieser Untergruppe ist ein Hinweis darauf, dass die Gen-Duplikation nach der Trennung von mono- und dikotylen Pflanzen erfolgt sein muss. Außer in *A. thaliana* ist das Vorkommen von zwei XOR-Genen bislang nur für den Seidenspinner (*B. mori*) beschrieben, dessen XDH-Gene hintereinander angeordnet und 1,6 kb voneinander entfernt sind (Kômoto *et al.*, 1999). Die beiden *A. thaliana*-Gene *AtXDH1* und *AtXDH2*, die sich ebenfalls in Tandem-Orientierung und nur durch 704 bp von-

einander getrennt auf Chromosom 4 befinden, stellen damit eine Ausnahme unter den bisher bekannten XOR-Genen dar. Bezogen auf die Situation in *A. thaliana* ist eine Gen-Duplikation jedoch nichts Ungewöhnliches. Der Großteil des Genoms besteht aus duplizierten Bereichen, die auf verschiedene Art und Weise entstanden sind (Walbot, 2000). Generell gibt es in Blütenpflanzen zwei Faktoren, die zu einer Vervielfachung von Genen beitragen: Einerseits gibt es die so genannte Polyploidisierung, die auf der Duplikation von größeren chromosomalen Abschnitten oder von ganzen Chromosomen beruht. Außerdem können lokale Genduplikationen auftreten, bei denen es zur Verdoppelung eines einzelnen Gens innerhalb des Chromosoms kommt.

Beide Prozesse haben im Verlauf der Evolution auch in *A. thaliana* stattgefunden. Mindestens 70% des *A. thaliana*-Genoms besteht aus duplizierten Segmenten. Daraus kann auf einen tetraploiden Vorfahren geschlossen werden kann. Des Weiteren liegen ca. 17% aller Gene in einer durch lokale Gen-Duplikation bedingten Tandem-Anordnung vor (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Anhand dieser Eigenschaften des *A. thaliana*-Genoms lässt sich die Entstehung der zwei XDH- und vier AO-Gene zurückverfolgen. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die AO nach einer frühen Duplikation des XDH-Gens durch so genannte Neofunktionalisierung entstanden ist (Rodríguez-Trelles *et al.*, 2003). Bei *A. thaliana* wird es nach der Entstehung von AO und XDH durch mehrfache Duplikation chromosomaler Abschnitte zur Bildung der vier AO-Gene gekommen sein. Diese befinden sich auf separaten Chromosomen (Abb. 3-1) und ihre Genprodukte nehmen teils verschiedene, teils gleiche Funktionen wahr (Sekimoto *et al.*, 1998). Die Tandem-Anordnung von *AtXDH1* und *AtXDH2* auf Chromosom 4 (Abb. 3-1) sowie die hohe Identität von 93% zwischen beiden Genen auf Protein- wie auf Nukleinsäureebene belegen indessen, dass die lokale Verdoppelung des XDH-Gens erst in jüngster Vergangenheit stattgefunden haben muss.

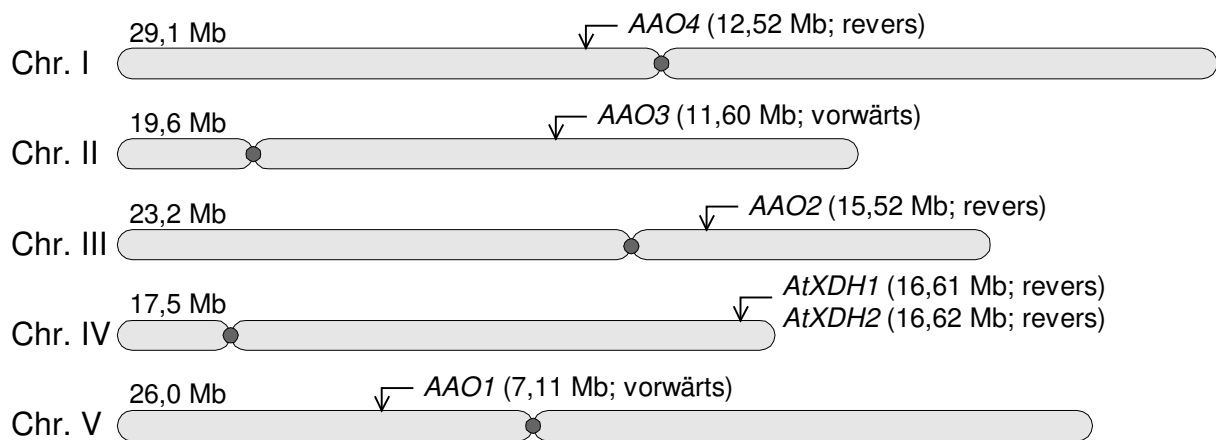


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Positionen von AO- und XDH-Genen auf den Chromosomen I-V von *A. thaliana*. Die Positionen der AO-Gene *AAO1*-*AAO4* und der XDH-Gene *AtXDH1* und *AtXDH2* sind in Megabasenpaaren (Mb) angegeben und durch Pfeile gekennzeichnet; die Centromer-Bereiche sind mit grauen Kreisen markiert.

3.1.2 *AtXDH1* und *AtXDH2* werden durch verschiedene Promotoren reguliert

Die Transkriptmengen von *AtXDH1* und *AtXDH2* unterscheiden sich deutlich voneinander. So bleibt beispielsweise der *AtXDH2* mRNA-Gehalt in verschiedenen Blatt-Entwicklungsstadien auf gleichem Niveau, während die *AtXDH1* Transkriptmenge in alternden und seneszenten Blättern stark erhöht ist. Diese unterschiedliche Expression verdeutlicht, dass es trotz des geringen Abstandes von nur 704 bp zwischen beiden Genen keinen gemeinsamen Promotor geben kann. Die regulativen Elemente des *AtXDH1*-Gens befinden sich daher zwangsläufig im intergenischen und im 3'-Bereich der *AtXDH2* (vgl. Abb. 2-1). Ein Vergleich der 2 kb großen putativen Promotorbereiche vor dem Start-ATG beider Gene zeigt lediglich vernachlässigbare Homologien auf. Stattdessen enthalten diese Bereiche unterschiedliche Promotor-Elemente. Dies deutet darauf hin, dass bei der Duplikation des XDH-Gens ausschließlich der codierende Bereich ohne die Promotor-Region erfasst wurde oder ein mitduplizierter Promotor wieder verloren ging.

Das Vorkommen von mehreren AO-Proteinen in Pflanzen ist keine Seltenheit. Außer für *A. thaliana* wurden beispielsweise für Mais (Sekimoto *et al.*, 1997) und Gerste (Omarov *et al.*, 1999) mehrere Isoformen der AO beschrieben. Aufgrund der phylogenetischen Daten wurden für die vier AOs in *A. thaliana* unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen vermutet, die durch die funktionelle Charakterisierung weiterer AO-Isoformen bestätigt wurden (Seo *et al.*, 1998; Seo *et al.*, 2000). Es bleibt zu klären, ob die Genprodukte von *AtXDH1* und *AtXDH2* ebenfalls unterschiedliche Aufgaben in der Pflanze erfüllen. Auf die mögliche Bedeutung beider XDHs in *A. thaliana* wird im Zusammenhang mit den Ergebnisse aus der Expressionsuntersuchung näher eingegangen.

3.2 Rekombinante Überexpression der *AtXDH1* im eukaryotischen System *P. pastoris*

Es ist grundsätzlich schwierig, eukaryotische Proteine ab einer bestimmten Größe in prokaryotischen Systemen rekombinant zu exprimieren. Auch von XOR-Proteinen ist bekannt, dass Expressionsversuche im Standard-System *E. coli* bislang erfolglos blieben. Aus diesem Grund wurde beispielsweise für die Expression der Rinder-XOR das aufwändige Baculovirus-Insektenzellen-System eingesetzt (Kuwabara *et al.*, 2003). Für die Expression des *AtXDH1*-Proteins bot sich dagegen die Verwendung der eukaryotischen Hefe *P. pastoris* an, in der bereits die der XDH sehr ähnlichen AO-Proteine aus *A. thaliana* erfolgreich exprimiert werden konnten. Die AAO1, AAO2 und AAO3 wurden in aktiver Form aus *P. pastoris* aufgereinigt und hinsichtlich ihrer Substratspezifität untersucht (Koiwai *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2000). Auch die rekombinante Überexpression der *AtXDH1* in *P. pastoris* brachte ein aktives

Protein mit allen für seine Aktivität erforderlichen posttranslationalen Modifikationen hervor, das somit für die funktionelle Charakterisierung geeignet war.

Insbesondere im Zusammenhang mit der Untersuchung der biochemischen Eigenschaften der AtXDH1 zeigte sich ein Vorteil der Verwendung von *P. pastoris* als Expressions-System: Die Hefe ist gut geeignet für die Kultur in einem Bioreaktor (Fermenter), so dass in kurzer Zeit große Proteinmengen erzeugt werden können. Erst die definierte und kontrollierbare Umgebung eines Fermenters ermöglicht hohe Zelldichten von bis zu 300 g/L. Bei der Expression sekretierter Proteine ist die Kultivierung im Fermenter nahezu obligatorisch, da die Konzentration des Produktes im Medium proportional zur Zelldichte in der Kultur ist. Doch auch intrazellulär exprimierte Proteine ergeben in der Regel eine höhere Ausbeute bei Fermenter-kultivierten Zellen als bei Expression im Schüttelkolben. Das wird nicht nur durch die höhere Zelldichte erreicht, sondern auch durch eine drei- bis fünfmal höhere Fremdgenexpression, bedingt durch die Methanol-Fütterung im Wachstums-limitierenden Bereich (Cereghino u. Cregg, 2000)

Der in dieser Arbeit verwendete *P. pastoris*-Stamm KM71 ist durch den Methanolverwertungs-Phänotyp *mut^s* („methanol utilization slow“) charakterisiert, bei dem lediglich die langsamere Alkoholoxidase 2 (AOX2) das angebotene Methanol umsetzen kann. Daher erfolgt das Wachstum auf Methanol als einziger Kohlenstoffquelle deutlich langsamer als bei Stämmen, die AOX1 und AOX2 nutzen können. Dem wird mit einer erheblich niedrigeren Methanolzufuhr rate während der Induktion Rechnung getragen. In mehreren Veröffentlichungen wird eine Inhibierung des AOX1-Promotors durch Glyzerin beschrieben (Buckholz u. Gleeson, 1991; Hollenberg u. Gellissen, 1997; Sreekrishna *et al.*, 1997), während in anderen Arbeiten bei der Fermentation von *mut^s*-Stämmen eine hohe Expressionsrate durch die gleichzeitige Fütterung von Glyzerin und Methanol während der Fremdgenexpression erreicht werden konnte (Brierley *et al.*, 1990; Letourneur *et al.*, 2001). Die Anwendung dieses so genannten „mixed-feed“-Verfahrens führte jedoch zu einem vollständigen Rückgang der AtXDH1-Expression. Eine Standard-Fermentation mit der ausschließlichen Zufuhr von Methanol während der Induktionsphase führte dagegen zu der erwarteten höheren AtXDH1-Proteinausbeute im Vergleich zur Expression im Schüttelkolben. Daraus ist auf eine Repression der Fremdgenexpression durch Glyzerin zu schließen.

Obwohl die AtXDH1 erfolgreich in *P. pastoris* rekombinant exprimiert werden konnte, belegen die Ergebnisse, dass die Überexpression der XDH zur Beeinträchtigung des Hefewachstums führt. So wächst der XDH-Expressionsklon nur schwach in Minimalmedien, wie die Expressionsversuche in MGYH/MMYH bzw. die Vorversuche im Fermentationsmedium FM22 deutlich zeigten. Der Ausgangsstamm KM71 sowie ein Testklon, der mit dem leeren Expressionsvektor pPICZA transformiert wurde, wuchsen problemlos in den erwähnten Me-

dien, so dass die Ursache in der integrierten XDH zu vermuten ist. Selbst wenn die Fremdgenexpression reprimiert sein sollte, d.h. bei Kultur der Hefen auf Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle, wächst der AtXDH1-Expressionsklon in den erwähnten Minimalmedien extrem langsam. Das im Genom von *P. pastoris* integrierte *AtXDH1*-Gen führt demnach zu einem grundlegenden Eingriff in den Hefe-Stoffwechsel. Denkbar wäre einerseits, dass durch die exogene AtXDH1 mehr Purine degradiert werden, als *P. pastoris* entbehren kann. Wahrscheinlich aber stellt die Herstellung eines großen und mit verschiedenen Cofaktoren beladenen Proteins eine so große Anforderung an den Biosynthese-Apparat der Hefe dar, dass andere Stoffwechsel-Prozesse zurückgedrängt werden.

3.3 Die biochemischen Eigenschaften des AtXDH1-Proteins

3.3.1 AtXDH1 repräsentiert eine Xanthinoxidoreduktase

Die in dieser Arbeit klonierte cDNA des *AtXDH1*-Gens kodiert für ein Protein aus 1361 Aminosäuren, das stärkere Homologien zu eukaryotischen XOR-Proteinen als zu AO-Proteinen aufweist und somit als XOR identifiziert wurde. Die funktionelle Charakterisierung der rekombinant exprimierten AtXDH1 bestätigte die aufgrund der Proteinsequenz erwarteten Eigenschaften. In der SDS-PAGE Analyse wurde für die AtXDH1 eine molekulare Masse von ca. 150 kDa bestimmt, die mit der kalkulierten Masse von 150,2 kDa für das Monomer inklusive des 6x His-Tag übereinstimmt. Das native Protein liegt als Homodimer vor, was anhand einer Gelfiltration und der anschließend errechneten molekularen Masse von 280-300 kDa bestätigt wurde. Wie bei den AOs erfolgt auch bei XORs die finale Aktivierung des Enzyms durch eine Moco-Sulfurase, die an das Mo einen terminalen Schwefel-Liganden anfügt. Die aus *P. pastoris* aufgereinigte AtXDH1 lag nur zum Teil sulfuriert vor, konnte aber durch eine Inkubation mit der rekombinant exprimierten *A. thaliana* Moco-Sulfurase ABA3 in ihrer Aktivität deutlich gesteigert werden. Wie für die AO α aus *A. thaliana* bereits beschrieben (Bittner *et al.*, 2001), konnte auch bei der AtXDH1 mittels Kaliumcyanid-Behandlung der terminale Schwefel-Ligand entfernt und das Enzym dadurch inaktiviert werden. Eine anschließende Behandlung mit ABA3 führte zu einer partiellen Rekonstitution der XDH-Aktivität. Daraus kann gefolgert werden, dass ABA3 unter nativen Bedingungen durch Sulfurierung den Aktivitätsstatus der AtXDH1 reguliert.

Die Substratspezifität der AtXDH1 kennzeichnet das Enzym eindeutig als XOR. Der bevorzugte Elektronenakzeptor der AtXDH1 ist NAD⁺, während AO-Proteine die Elektronen auf O₂ oder künstliche Substanzen wie DCIP und Ferricyanid übertragen (Rajagopalan u. Handler, 1964). Allopurinol, ein vielbeschriebener XOR-Inhibitor (Massey *et al.*, 1970), führt auch bei der AtXDH1 zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität. Als Isomer des Xanthins wird

Allopurinol vom Enzym zu Alloxanthin umgesetzt (Abb. 3-2). Dieses kann aus der Substrat-Bindungstasche nicht mehr freigegeben werden und führt somit zu einer irreversiblen Inhibierung der XOR (Robins *et al.*, 1985). Die AtXDH1 vermag eine ganze Reihe von Aldehyden und N-Heterozyklen zu oxidieren. Zwar werden insbesondere aromatische Aldehyde wie Indol-3-carbaldehyd oder 1-Naphthaldehyd umgesetzt, die Hauptreaktionen sind jedoch die Hydroxylierung von Hypoxanthin zu Xanthin (Abb. 3-2) und von Xanthin zu Harnsäure, wie die hohe Reaktivität der AtXDH1 gegenüber beiden Substraten belegt. Dagegen wird Xanthin von AO-Proteinen überhaupt nicht umgesetzt, da diese nicht in der Lage sind, Purinderivate mit zwei C-Substituenten zu oxidieren (Krenitsky *et al.*, 1972).

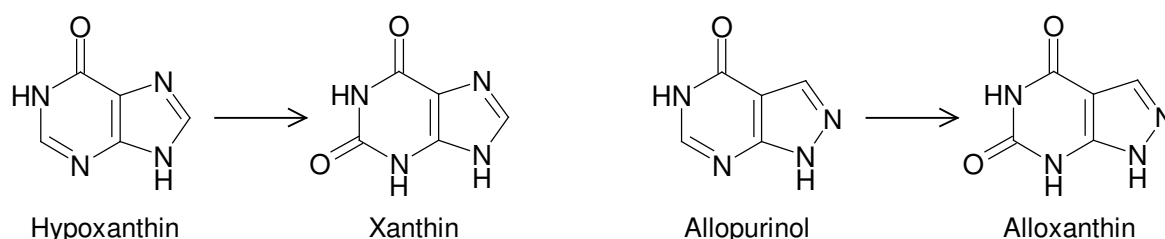


Abb. 3-2: Strukturformeln der XDH-Substrate Hypoxanthin und Xanthin sowie des Inhibitors Allopurinol. Hypoxanthin wird von der XOR zu Xanthin oxidiert, das weiter zu Harnsäure umgesetzt wird. Das Hypoxanthin-Isomer Allopurinol wird zu Alloxanthin umgesetzt, das anschließend aus dem aktiven Zentrum nicht mehr freigesetzt wird.

Die Analyse der AtXDH1-Proteinsequenz untermauerte die Ergebnisse der Substratspezifitäts-Untersuchung. Zwei definierte Aminosäuren sind für die Bindung und insbesondere die korrekte Positionierung der Purinsubstrate bei XOR-Proteinen erforderlich. Ein Arginin an Position 909 (bezogen auf die AtXDH1-Proteinsequenz) bestimmt die Position der Substrat-Hydroxylierung, indem es die einwandfreie Orientierung des Substrates in Relation zum Moco-Reaktionszentrum vermittelt (Glatigny *et al.*, 1998). Bei der XDH in *E. nidulans* führte der Austausch dieses Arginins in ein Glycin dazu, dass die Hydroxylierung des Substrates am C-8 statt wie üblich am C-6 Atom erfolgte (Glatigny *et al.*, 1998). Die zweite erforderliche Aminosäure für die Substraterkennung ist das Glutamat 831, das für die Unterschiede in der Substratspezifität zwischen XORs und AOs verantwortlich ist (Huber *et al.*, 1996). Das partielle Alignment von AtXDH1 und AtXDH2 mit weiteren XOR-Proteinen sowie mit den AOs aus *A. thaliana* zeigt die Existenz dieses konservierten Glutamat- bzw. Arginin-Restes innerhalb der Moco-Domäne aller XOR-Proteine, während die entsprechenden Aminosäuren in AO-Proteinen nicht vorkommen (Abb. 3-3A).

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen XDH- und AO-Proteinsequenzen ist das Vorkommen des Sequenz-Motivs „FFXYRK“ innerhalb der FAD-Domäne der XDHs (Abb. 3-3B). In der im Vergleich zu [Fe-S]-Zentren- und Moco-Bindungsdomäne weniger stark konservierten FAD-Bindungsdomäne enthalten alle XOR-Proteine das für die Bindung des phy-

3.3.2 AtXDH1 liegt ausschließlich in der Dehydrogenase-Form vor

Die XOR-Proteine der Säugetiere werden als Dehydrogenase synthetisiert und kommen in frisch präparierten Proben hauptsächlich in dieser Form vor. Durch limitierte Proteolyse oder Modifikation der Cystein-Reste können sie jedoch leicht in die Oxidase-Form überführt werden (Della Corte u. Stirpe, 1968). Oxidase- und Dehydrogenase-Form der XOR unterscheiden sich in den Elektronenakzeptoren in der reduktiven Halbreaktion des Enzyms. Die XDH zeigt eine Präferenz für NAD^+ , wobei eine Restaktivität mit O_2 vorhanden ist. Demgegenüber kann die XO nicht mit NAD^+ reagieren und überträgt die Elektronen ausschließlich auf O_2 .

Die reversible Umwandlung der XDH in die XO erfolgt durch Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen und kann *in vitro* z.B. 1-Fluor-2,4-dinitrobenzen erzielt werden. Infolge einer solchen Behandlung kommt es bei Ratten- und Rinder-XDH zur Ausbildung einer Disulfid-Brücke zwischen dem an die FAD-Domäne anschließenden „Linker“ und der Moco-Domäne (Nishino u. Nishino, 1997; Rasmussen *et al.*, 2000). Diese Disulfid-Brücke wird von zwei in allen Säuger-XORs vorhandenen Cystein-Resten (Cys-535 und Cys-992 in der Rinder XOR, Abb. 3-4) gebildet und ist der Auslöser für weitergehende Modifikationen des Enzyms. Die ausschließlich in der Dehydrogenase-Form vorkommenden XDH-Proteine aus Hühnchen und *D. melanogaster* enthalten wie AtXDH1 und AtXDH2 ein Arginin an Stelle des Cys-992, welches die Ausbildung einer Disulfid-Brücke verhindert. Daher ist davon auszugehen, dass eine reversible XDH/XO-Umwandlung von AtXDH1 und AtXDH2 nicht möglich ist.

Die Aufklärung der Kristallstruktur von Dehydrogenase- und Oxidase-Form der Rinder-XOR demonstrierte, dass es durch die proteolytische Umwandlung von der XDH in die XO zu einer Konformationsänderung im Bereich der FAD-Domäne kommt. Ein aus sauren und basischen Aminosäure-Resten bestehender „Loop“ verändert seine Position dahingehend, dass er den Zugang des NAD^+ zum FAD-Cofaktor blockiert (Enroth *et al.*, 2000). Dieser geladene „Loop“ umfasst Gln-423 bis Lys-433 im Rinder-Enzym und ist unter den XOR-Proteinen stark konserviert (Abb. 3-4). Auffällig ist, dass ausschließlich die Säuger-Enzyme an der entsprechenden Position (433 in der Rinder-XOR) ein Lysin enthalten, während die Dehydrogenasen aus Hühnchen und *D. melanogaster* sowie AtXDH1 und AtXDH2 ein Isoleucin mit unpolarer Seitenkette aufweisen.

Als ausschlaggebend für die Neu-Strukturierung des beschriebenen „Loops“ wurde in der Rinder-XOR eine Gruppe von Aminosäuren identifiziert, die sich aus Arg-335, Trp-336 und Arg-427 in der FAD-Domäne und Phe-549 im darauf folgenden Linker zusammensetzt (Abb. 3-4). Es wird angenommen, dass diese AS-Reste zwei Funktionen bei der XDH/XO-Konversion erfüllen (Kuwabara *et al.*, 2003). Einerseits öffnen sie einen Tunnel, der in der XO den Zugang des O_2 zum FAD erleichtert. Andererseits übertragen sie die Veränderungen in der „Linker“-Region auf den geladenen „Loop“ und bewirken so dessen Konformationsän-

derung. Sowohl Proteolyse als auch Modifikationen von SH-Gruppen im „Linker“ führen zu einem Verlust der Phe-549 – Trp-336 Interaktion, was über eine Umorientierung des Arg-427 letztendlich die grundlegende Konformationsänderung des gesamten „Loop“ (Gln-423 – Lys-433) verursacht. Wie in Abb. 3-4 zu erkennen ist, sind Arg-335, Trp-336, Arg-427 und Phe-549 gemeinsam lediglich in den Säuger-XORs konserviert. In der AtXDH1- und AtXDH2-Sequenz befindet sich an Stelle des Arg-335 ein Lysin und statt des Phe-549 ein Valin (Abb. 3-4). Es ist anzunehmen, dass insbesondere der Phenylalanin-Valin Austausch die Bildung der für die Rinder XOR beschriebenen AS-Interaktionen verhindert und damit eine Umwandlung der AtXDH1 und AtXDH2 von der Dehydrogenase- in die Oxidase-Form nicht möglich ist.

Arg-335 Trp-336		Arg-427		Cys-535	Phe-549	Cys-992
↓		↓		↓	↓	↓
BtXDH	EQLRWFAGKQ 341	FKQASRREDDIAKVT 435	DKCGKLDPTYTSATLLFQK 551	FNKENCWKKRGL 998		
RnXDH	EQLRWFAGKQ 341	FKQASRREDDIAKVT 435	DMCGKLDPTFASATLLFQK 552	FNRENCWKKRGL 999		
MmXDH	EQLRWFAGKQ 344	FKQASRREDDIAKVT 438	GMCGKLDPTFASATLLFQK 555	FNRENCWKKRGL 1002		
HsXDH	EQLRWFAGKQ 341	FKQASRREDDIAKVT 435	DKCGKLDPTFASATLLFQK 552	FNKENCWKKRGL 999		
GgXDH	EQLRWFAGPQ 368	FKQAYRREDDIAIVT 462	NLCEPVPPNYISATELFHK 581	FNKQNRWKKRGM 1028		
DmXDH	DMLHYFAGKQ 340	FKQARRRDDIAIVN 438	TSSDALPSEERSGAETFHT 554	FNRENWRKKRGM 1004		
AtXDH1	EQLKWFAGTQ 370	FKQAHRRDDIAIVN 464	SAIETFPPSHMSAVQVPR 581	FNSHNRWKKRGV 1028		
AtXDH2	EQLKWFAGTQ 360	FKQAHRRDDIAIVN 454	PTIETFPPSHMSAVQLVPR 571	FNSHNRWKKRGV 1018		
	: * : : * * *	**** * : * * * * *	. . . * . . .	** . * * : * * :		

Abb. 3-4: Alignment der für die XDH/XO-Konversion relevanten XOR-Bereiche.

Eine schwarze Box kennzeichnet den aus geladenen AS bestehenden „Loop“ (Gln-423 – Lys-433), der in der XO den Zugang für NAD⁺ zum FAD blockiert. Ein Gruppe von weiteren für die XDH/XO-Konversion erforderlichen AS ist durch (↓) gekennzeichnet; die für die reversible XDH/XO-Konversion notwendigen Cysteine sind durch (▼) benannt. Die Positionen der mit Pfeilen gekennzeichneten AS sind auf die Rinder-XOR bezogen. Die GenBank Accession-Nr. der verwendeten Proteine sind: *B. taurus* XOR (CAA58497), *R. norvegicus* XOR (P22985), *M. musculus* XOR (Q00519), *H. sapiens* XDH (P47989), *G. gallus* XDH (P47990), AtXDH1 (AY171562), AtXDH2 (AY518202).

Die rekombinant exprimierte AtXDH1 zeigt in frischen Präparationen eine hohe Reaktivität gegenüber NAD⁺. Demgegenüber ergibt sich lediglich eine Umsatzrate von 2,5% bei Verwendung von O₂ als Elektronenakzeptor. Eine Behandlung des Enzyms mit Trypsin führt zu einem Rückgang der Aktivität, ohne dass es zu einem Anstieg der Reaktivität gegenüber O₂ kommt (eigene unveröffentlichte Daten). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Proteinsequenz-Analyse kann die AtXDH1 demnach als reine Dehydrogenase bezeichnet werden, die weder reversibel noch irreversibel in eine Oxidase zu überführen ist. Auch die nativ aufgereinigte XOR aus Weizenblättern (*T. aestivum*), aus Blättern von diversen *Fabaceae* wie Sojabohne (*Glycine max*), Linse (*Lens esculenta*), Klee (*Trifolium pratense*, *Trifolium repens*) und Kuhbohne (*Vigna unguiculata*) sowie aus der Grünalge *C. reinhardtii* liegt ausschließlich in der Dehydrogenase-Form vor (Montalbini, 1998; Montalbini, 2000; Pérez-Vicente *et al.*, 1988). Zwar beschreiben Corpas und Mitarbeiter im Gegensatz dazu (1993), dass in aufgereinigten Peroxisomen aus Erbsenblättern (*P. sativum*) die XOR zu 60% in der Oxidase-Form vorliegt. Auch wenn berücksichtigt wird, dass andere pflanzliche XDHs von

der AtXDH1 abweichende Eigenschaften besitzen können, lassen die zitierten Arbeiten mit nativ aufgereinigter XDH sowie die eigenen Untersuchungen die Richtigkeit der von Corpas und Mitarbeitern gemachten Beobachtungen fraglich erscheinen. Dies gilt um so mehr, da ganze Organellen und keine spezifischen Enzyme aufgereinigt wurden.

3.3.3 Bildung von Superoxidradikalen durch die AtXDH1

Sowohl die Dehydrogenase- als auch die Oxidase-Form der XOR-Proteine bilden Superoxid-Anionradikale ($O_2^{\cdot-}$), wenn O_2 als Elektronenakzeptor genutzt wird. Je nach Anzahl der übertragenen Elektronen entsteht bei der Reduktion von O_2 entweder Wasserstoffperoxid bei der Übertragung von zwei Elektronen oder ein Superoxidradikal, wenn ein Einzelelektron übertragen wird. Die XOR-Proteine bilden beide Substanzen, sofern Xanthin und O_2 als Substrate genutzt werden (Harris u. Massey, 1997). Im Vergleich zur XO produziert die XDH jedoch mehr Superoxidradikale pro Mol umgesetzten Sauerstoffs. Bezogen auf die Reaktion mit O_2 erzeugt die Hühnchen-XDH 40-44% (Nishino *et al.*, 1989) und die Rinder-XDH 35-42% Superoxidradikale, während die Oxidase-Form des Rinder-Enzyms lediglich 30% Superoxidradikale produziert (Hunt u. Massey, 1992). Diese Unterschiede liegen in veränderten Redoxpotentialen des FAD-Zentrums bei XDH und XO begründet. In der XDH existiert das Flavin-Radikal ($FADH^{\cdot}$, Abb. 3-5) in einem thermodynamisch stabilisierten Zustand, d.h. das Redoxpotential des $FADH^{\cdot}/FADH_2$ -Paares ist niedriger als das des $FAD/FADH^{\cdot}$ -Paares (Hunt *et al.*, 1993). Auf der anderen Seite ist das Redoxpotential des $FADH^{\cdot}/FADH_2$ -Paares immer höher als das des $FAD/FADH^{\cdot}$ -Paares in der XO. Das stabilisierte Flavinsemichinon reagiert direkt mit O_2 unter Bildung von Superoxidradikalen und bedingt so den in Relation höheren Anteil der Superoxidradikal-Bildung in der XDH.

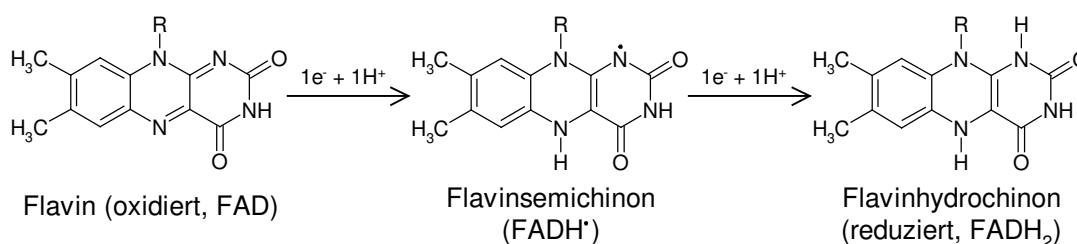


Abb. 3-5: Strukturformeln der reduzierten und oxidierten Form des FAD sowie des Flavin-Radikals (Mitte).

Auch die rekombinant exprimierte AtXDH1 bildet Superoxidradikale, allerdings ist ihr Anteil mit 22% am umgesetzten Sauerstoff relativ gering. Obwohl die AtXDH1, auch aufgrund ihrer geringen Reaktivität mit O_2 , eindeutig als Dehydrogenase zu bezeichnen ist, ist die relative Superoxidradikal-Produktion vergleichbar mit der der Rinder-XO. Die AtXDH1 (und die AtXDH2) zeigen in der Proteinsequenz der FAD-Domäne einige Abweichungen nicht nur von den Säuger-XORs, sondern auch von den Sequenzen der reinen Dehydrogenasen aus

Hühnchen oder *D. melanogaster*. Möglicherweise verhindern AtXDH1-spezifische AS-Austausche innerhalb der FAD-Bindungsspalte die Stabilisierung des Flavin-Radikals und vermindern dadurch den Anteil der entstehenden Superoxidradikale auf ein für Oxidasen typisches Maß.

Die physiologische Bedeutung der Superoxidradikal-Produktion durch die XDH in Säugetieren bleibt unklar, da die Entstehung von Superoxid in Gegenwart von NAD^+ nahezu vollständig inhibiert wird und in der Zelle unter normalen Bedingungen ein Überschuss an NAD^+ herrscht (Nishino, 1994). Andererseits scheint eine kurzfristige Erschöpfung der für die XDH verfügbaren NAD^+ -Menge auszureichen, um eine von der XDH katalysierte Superoxidradikal-Bildung hervorzurufen (Harris u. Massey, 1997). Ob die AtXDH1 *in vivo* Superoxidradikale generiert, konnte bisher nicht untersucht werden. Die beobachtete Regulation der AtXDH1 deutet jedoch auf eine Beteiligung des Enzyms an Prozessen hin, welche die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies erfordern und somit eine Superoxidradikal-Produktion durch die AtXDH1 *in vivo* nahe liegend und wahrscheinlich erscheinen lassen.

3.4 Die Regulation der XDH und ihre Bedeutung *in vivo*

3.4.1 Der Purin-Katabolismus in Pflanzen

Die XDH erfüllt als Schlüsselenzym des Purin-Katabolismus' eine grundlegende Funktion im Stoffwechsel der Pflanze. In den meisten Pflanzen verläuft der Abbau der Purin-Nukleotide nach dem in Abb. 3-6 dargestellten Schema (zusammengefasst durch Moffatt u. Ashihara, 2002). Die Degradation des Adenosinmonophosphates (AMP) beginnt mit dessen Deaminierung zu Inosinmonophosphat (IMP), das dann durch Dephosphorylierung in Inosin umgewandelt wird. Beim Abbau des Guanosinmonophosphates (GMP) erfolgt in umgekehrter Reihenfolge zunächst die Dephosphorylierung und daran anschließend die Deaminierung. Die entstandenen Nukleoside Inosin bzw. Xanthosin werden durch Hydrolyse des Zuckers zu Hypoxanthin bzw. Xanthin umgesetzt. Die XDH katalysiert nun die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure. Deren Abbauprodukt Allantoin wird zu Allantoinsäure, die in Harnstoff und Ureidglykolat hydrolysiert wird. Aus Harnstoff entstehen Ammoniak (NH_3) und Kohlendioxid (CO_2), welche die Endprodukte der Purindegradation darstellen. In *A. thaliana* wird der Purin-Abbau derzeit nicht untersucht, er verläuft jedoch wahrscheinlich nach dem beschriebenen Schema.

In Vertretern der *Aceraceae*, *Plantanaceae* und *Boraginaceae* erfolgt der Purin-Katabolismus nur bis zu den Ureiden Allantoin und Allantoinsäure, die insbesondere in Wurzeln und Stamm bzw. Stängel eingelagert werden und als Stickstoff-Speicher dienen. Im Bedarfsfall werden diese Ureide in die Blätter transportiert und dort komplett degradiert (Moffatt u. Ashi-

hara, 2002). Ein bekannter Vertreter solcher Ureide-speichernden Pflanzen ist der Beinwell (*Symphytum officinale*), bei dem die Hälfte des in der Pflanze enthaltenen Stickstoffs als Allantoin vorliegt (Reinbothe u. Mothes, 1962). Ob *A. thaliana* ebenfalls Ureide speichert oder ob nur die komplette oxidative Aufspaltung der Purine stattfindet, ist noch nicht geklärt.

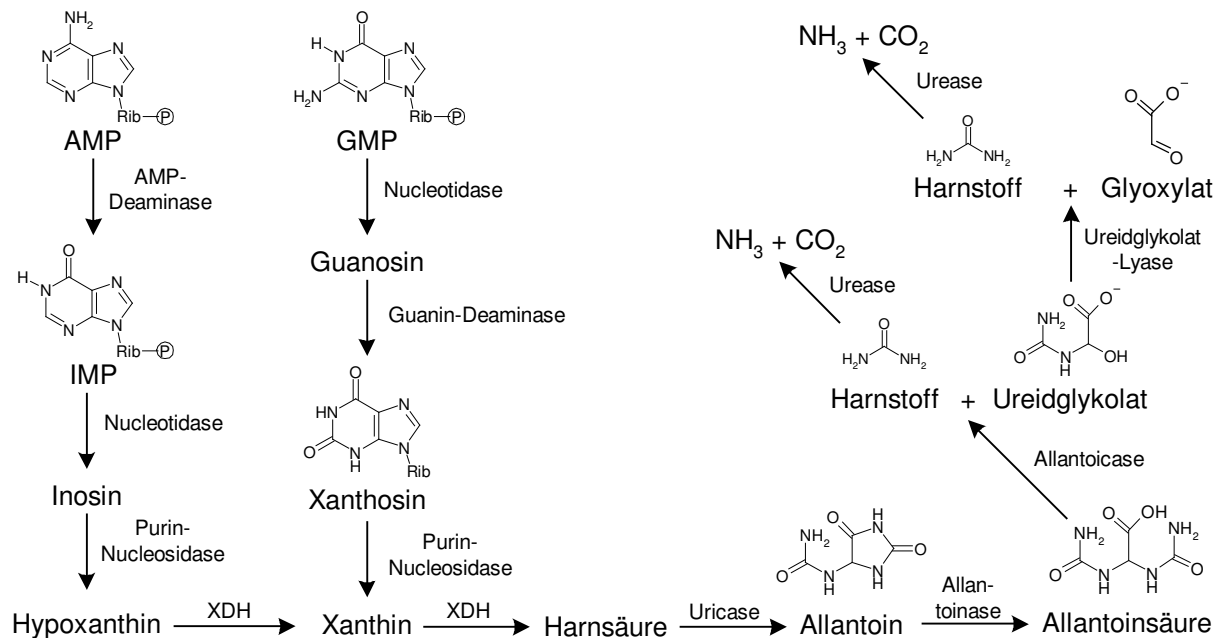


Abb. 3-6: Katabolismus der Purin-Nukleotide in Pflanzen.

Dargestellt ist das Schema des Standard-Purinabbaus, wie er in den meisten Pflanzen abläuft (modifiziert nach Moffat u. Ashihara, 2002).

3.4.2 Die pflanzliche XDH erfüllt weitere Funktionen

In einigen Pflanzen aus der Familie der *Fabaceae* erfüllt die XDH eine Aufgabe im primären Stickstoff-Metabolismus. Die *Fabaceae* gehen mit Stickstoff-fixierenden Bakterien eine Symbiose ein, um sich auf diese Weise mit Stickstoff zu versorgen. Die so genannten Knöllchenbakterien (*Rhizobium spec.*) werden im Rahmen einer kontrollierten Infektion in Wurzelzellen der Pflanze aufgenommen und veranlassen sie zur Ausbildung von Wurzelknöllchen. Die zu Bakterioiden herangewachsenen *Rhizobien* liefern den fixierten Luftstickstoff (N₂) in Form von Ammonium (NH₄⁺) an die Wirtszelle. Je nach Transportform des fixierten Stickstoffs werden die Vertreter der *Fabaceae* einer von zwei Gruppen zugeordnet (Schubert, 1986). Amid-Bildner wie die Lupine (*Lupinus spec.*), Erbse (*P. sativum*) und Luzerne (*Medicago spec.*) assimilieren und transportieren den fixierten Stickstoff als Glutamin und Asparagin. Viele tropische *Fabaceae* wie z.B. Sojabohne (*G. max*), Kuhbohne (*V. unguiculata*) und Bohne (*P. vulgaris*) gehören dagegen in die Gruppe der Ureid-Bildner. Bei diesen Pflanzen wird ein Großteil des fixierten Stickstoffs in den infizierten Zellen der Wurzelknöllchen für die Synthese von Purinen verwendet, die dann durch die XDH zu Harnsäure oxidiert werden. In

benachbarten uninfizierten Zellen erfolgt der Abbau der Harnsäure zu Allantoin und Allantoinensäure. Diese Ureide werden aus den Knöllchen ins Xylem exportiert und bilden den Großteil des für die Pflanzenernährung benötigten Stickstoffs (Atkins u. Smith, 2000). Mit einem Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnis (C:N) von 1:1 stellen die Ureide sehr stickstoffreiche Verbindungen dar im Vergleich zu Asparagin und Glutamin mit einem C:N-Wert von 2,0 bzw. 2,5. Der Bedarf an verfügbaren C-Skeletten für die NH_3 -Assimilation ist in den Amidebildenden *Fabaceae* damit deutlich höher als in den Ureide-Bildnern, die tatsächlich im Vergleich weniger Energie verbrauchen (Layzell *et al.*, 1979). In den Wurzelknöllchen von Ureidebildenden *Fabaceae* wurden die höchsten XDH-Aktivitäten in Pflanzen gefunden, die 500-1000fach über den in Blättern gemessenen Aktivitäten liegen (Nguyen, 1986). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit dieses Stoffwechselweges in den entsprechenden Pflanzen.

Nicht auf Stickstoff-fixierende Pflanzen beschränkt, sondern von allgemeiner Bedeutung in Pflanzen ist die hypersensitive Reaktion (HR) als Antwort auf Pathogenbefall. Dabei kommt es zum „Selbstmord“ der mit Pathogenen befallenen Zellen, dem so genannten programmierten Zelltod („programmed cell death“, PCD). Rund um solche nekrotischen Lokalläsionen schottet die Pflanze durch vermehrte Ligninsynthese das benachbarte Gewebe ab, um eine Ausbreitung der Infektion zu verhindern. Bei der Entstehung dieser HR konnte der XDH eine direkte Beteiligung nachgewiesen werden. Werden Bohnenblätter (*P. vulgaris*) mit dem phytopathogenen Pilz *Uromyces phaseoli* infiziert, steigt die XDH-Aktivität an und vermittelt anscheinend die Ausbildung der HR (Montalbini, 1992a). Wird die XDH-Aktivität in der Pflanze durch Allopurinol inhibiert, unterbleibt auch die HR. Ähnliches wurde in Weizenblättern und -samen beobachtet, die mit *Puccinia recondita* infiziert wurden. Auch in diesem Fall unterdrückt Allopurinol die Hypersensitivitäts-Anwort (Montalbini, 1992b). In beiden Pflanzen ist nach deren Infektion außer der XDH- auch die Uricase-Aktivität stark erhöht. Die Uricase setzt die von der XDH generierte Harnsäure zu Allantoin um (Abb. 3-6) und setzt dabei H_2O_2 und CO_2 frei. Montalbini vermutet als Auslöser für die HR entweder von der XDH produzierte Superoxidradikale oder Hydroxylradikale (OH^\bullet), die aus $\text{O}_2^{\bullet -}$ und von der Uricase produziertem H_2O_2 entstehen können.

Nachgewiesen ist, dass die Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) essentiell ist für die Regulation des PCDs (Morel u. Dangel, 1997). Während in einigen Pflanzen wie Tabak (*N. tabacum*) und Tomate (*Lycopersicon esculentum*) für die Entstehung des PCDs Wasserstoffperoxid verantwortlich ist (Schraudner *et al.*, 1998; Wohlgemuth *et al.*, 2002), hängt in *A. thaliana* das Auftreten lokaler Läsionen von Superoxidradikalen ab (Jabs *et al.*, 1996). Zusammen mit den bekannten ROS-produzierenden Enzymen NADPH-Oxidase und der mitochondrialen Alternativen Oxidase (Overmyer *et al.*, 2003) produziert eine nach Pathogenbefall stark aktivierte AtXDH1 wahrscheinlich ebenfalls Superoxidradikale und ist somit an der Vermittlung des PCDs in *A. thaliana* beteiligt.

3.4.3 Die AtXDH1 wird durch diverse Stresse reguliert

Die Beteiligung der pflanzlichen XDH an der hypersensitiven Reaktion lässt vermuten, dass dem Enzym eine Rolle in weiteren Prozessen zukommt, die mit reaktiven Sauerstoffspezies in Zusammenhang stehen. Durch die Untersuchung der XDH-Expression in *A. thaliana* konnte diese Annahme bestätigt werden. Tabelle 3-1 fasst die Veränderungen der XDH-Expression in alternden und seneszenten Blättern sowie nach Applizierung verschiedener Stresse zusammen. Die *AtXDH2*-Transkriptmenge wird durch die getesteten Bedingungen nicht beeinflusst und bleibt konstant auf gleichem Niveau. Die relative mRNA-Menge der *AtXDH1* steigt im Blatt nach Salz- und Trockenstress sowie bei natürlicher Seneszenz an, während nach Trockenstress in Wurzeln und Kältebehandlung in Blättern ein Rückgang der mRNA-Menge zu verzeichnen ist. Die Zunahme der *AtXDH1* mRNA-Menge im Blatt nach Trockenheit wird von einem erhöhten ABA-Gehalt vermittelt (vgl. Abb. 2-7B) und ist somit nur indirekt vom Trockenstress abhängig. Mit wenigen Ausnahmen stimmen die Veränderungen der XDH-Aktivität mit denen der *AtXDH1* mRNA-Menge überein. Lediglich nach der Applizierung von Salzstress sowie in alternden Blättern bleibt die XDH-Aktivität unverändert, obwohl die mRNA-Menge der *AtXDH1* ansteigt. Diese Unterschiede in mRNA-Menge und Enzym-Aktivität lassen sich durch die Tatsache erklären, dass die XDH ebenso wie die AO der post-translationalen Aktivierung durch die Moco-Sulfurase ABA3 bedarf. In Abhängigkeit von den herrschenden Umweltbedingungen kontrolliert ABA3 die Aktivität von AO und XDH durch Veränderung des Verhältnisses von sulfuriertem/aktivem zu nicht-sulfuriertem/inaktivem Enzym (Bittner *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 2001). Die tatsächliche XDH-Aktivität ist damit relativ unabhängig von der vorhandenen Menge an Holoenzym. Anscheinend erhöht ABA3 in seneszenten Blättern den Anteil der aktiven XDH weit über die übliche Menge hinaus, während bei beginnender Alterung zwar die *AtXDH1*-Transkriptmenge an-

Tab. 3-1: Veränderungen der XDH Expression unter verschiedenen Bedingungen.

Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben auf Blattmaterial. (+) kennzeichnet eine Zunahme, (-) eine Abnahme der relativen mRNA-Menge bzw. Enzym-Aktivität; k.V. = keine Veränderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Stress	Zunahme oder Abnahme von		
	<i>AtXDH1</i> mRNA	<i>AtXDH2</i> mRNA	XDH-Aktivität
Salz	+	k.V.	k.V.
Kälte/Frost	-	k.V.	-
Trockenheit (Blatt)	+	k.V.	+
Trockenheit (Wurzel)	-	k.V.	-
beginnende Alterung	+	k.V.	k.V.
natürliche Seneszenz	+	k.V.	++

steigt, ABA3 dies jedoch nicht als Signal zur Aktivierung der XDH erkennt.

Die Untersuchung der *AtXDH1*- und *AtXDH2*-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR erlaubt eindeutig eine getrennte Analyse beider Transkript-Mengen. Im Gegensatz dazu kann in *A. thaliana* lediglich XDH-Aktivität nachgewiesen werden, ohne dass diese dem *AtXDH1*- oder *AtXDH2*-Protein direkt zugeordnet werden kann. Die im *in Gel*-Aktivitätsnachweis detektierte XDH-Bande in *A. thaliana* Rohextrakt zeigt zwar die gleiche Mobilität im nativen Gel wie die rekombinant exprimierte *AtXDH1*. Dies ist jedoch kein Indiz für die alleinige Präsenz dieser XDH-Isoform. Da *AtXDH1* und *AtXDH2* annähernd gleiche physikalisch-chemische Eigenschaften besitzen, weisen beide Proteine im nativen Gel wahrscheinlich ein identisches Laufverhalten auf und ließen sich nicht voneinander trennen. Ob in *A. thaliana* beide Isoenzyme *AtXDH1* und *AtXDH2* vorhanden sind und in aktiver Form vorliegen, ist mit dem verwendeten *in Gel*-Aktivitätsnachweis nicht zu klären.

Die Untersuchung der XDH-„knock out“ Mutanten legt nahe, dass beide Proteine in aktiver Form in der Pflanze existieren. Die *AtXDH1*-ko Linie, in der folgerichtig lediglich *AtXDH2* aktiv vorliegen kann, zeigt eine gleich bleibende XDH-Aktivität, die auch in seneszenten Blättern unverändert ist (vgl. Abb. 2-9E). Diese Beobachtung findet die Entsprechung in der gleich bleibenden *AtXDH2* mRNA-Menge im Wildtyp und deutet auf eine konstitutive Expression des *AtXDH2*-Proteins hin, das zu jeder Zeit voll sulfuriert/aktiv vorliegen muss. In der *AtXDH2*-ko Linie ist entsprechend lediglich *AtXDH1*-Protein vorhanden, und auch in dieser Mutante ist XDH-Aktivität zu detektieren, die zudem in seneszenten Blättern stark ansteigt (vgl. Abb. 2-9E). Dementsprechend scheint die *AtXDH1* das bei Seneszenz und bei Stress-einwirkung hochregulierte Enzym zu sein. Dafür sprechen zusätzlich die Übereinstimmung der Veränderungen von *AtXDH1*-Transkriptmenge und XDH-Aktivität im Wildtyp sowie das Vorkommen der entsprechenden regulativen Promotorelemente in der putativen Promotor-Region der *AtXDH1*.

3.4.4 Die putativen XDH-Promotoren enthalten Stress-abhängige Regulations-Elemente

Die in den putativen Promotor-Regionen beider XDH-Gene gefundenen Regulations-elemente bestätigen die Beobachtung, dass beide XDH-Transkripte unterschiedliche Funktionen innehaben. Vor dem 5'-Bereich der *AtXDH1* finden sich verschiedene Elemente, welche die Bindung von Stress-abhängigen Transkriptionsfaktoren ermöglichen. Zwei „ABA-response elements“ (ABRE) unterstreichen die ABA-vermittelte XDH-Regulation bei verschiedenen abiotischen Stressen. Typisch ist das Vorkommen von mehreren W-Boxen, an die die WRKY-Transkriptionsfaktoren binden. Die WRKY-Faktoren sind involviert in Verteidigungsreaktionen bei Pathogenbefall und Entwicklungsprozessen (Eulgem *et al.*, 2000). Für

AtWRKY53 wird eine Funktion bei der Regulation der Blattseneszenz beschrieben (Hinderhofer u. Zentgraf, 2001). Die G-Box ist an der Induzierbarkeit pflanzlicher Promotoren durch Licht, Anaerobiose und Phytohormone beteiligt, wobei für die Bindung der Transkriptionsfaktoren weitere *cis*-Elemente in unmittelbarer Nachbarschaft erforderlich sind (Menkens et al., 1995). Anhand dieser Promotor-Elemente kann gefolgert werden, dass die AtXDH1 für die Stress-Anpassung und Seneszenz von Bedeutung ist. Auf diesen Zusammenhang deuten auch die beobachteten Veränderungen des AtXDH1-Transkripts hin.

Da die stärksten Veränderungen auf Transkriptebene in seneszenten Blättern auftraten, wäre ein Vergleich mit weiteren Seneszenz-involvierten Regulationselementen hilfreich. Jedoch wurden bei Sequenzvergleichen der Promotor-Regionen von Seneszenz-assoziierten Genen (SAG) bisher keine Ähnlichkeiten und damit kein weiteres gemeinsam wirkendes *cis*-Element gefunden (Gan u. Amasino, 1997). Darauf aufbauende Untersuchungen waren somit nicht möglich.

Die putative Promotor-Region der *AtXDH2* unterscheidet sich deutlich von der des *AtXDH1*-Gens. Beispielsweise sind ein ABRE sowie W- und G-Boxen nicht enthalten, es finden sich jedoch zwei bei Trockenstress wirksame Elemente (DRE, „drought response element“). Auffällig ist das gehäufte Auftreten von Opaque2- und ROM2-Boxen. Die zur Klasse der basischen Leucin-„Zipper“ gehörenden Transkriptionsfaktoren Opaque2 und ROM2 werden hauptsächlich während der Fruchtreifung exprimiert (Chern et al., 1996; Yunes et al., 1994). Neben der grundlegenden Funktion der Purindegradation wäre eine besondere Bedeutung der *AtXDH2* während der Fruchtreifung von *A. thaliana* denkbar. Für diese Annahme spricht auch, dass in Avocado-Früchten (*Persea americana*) eine Inhibierung der XDH-Aktivitäten durch Allopurinol zu einem Stillstand der Fruchtentwicklung führt (Taylor u. Cowan, 2004).

3.4.5 AtXDH1 im Zusammenhang mit Seneszenz und reaktiven Sauerstoffspezies

Die Bedeutung der erhöhten XDH-Aktivität nach Trockenstress und bei natürlicher Seneszenz ist nicht vollkommen klar. In diesem Zusammenhang stellt die Bildung von ROS nur eine der möglichen Funktionen der XDH dar. Da der stärkste Anstieg des *AtXDH1*-Transkripts und der XDH-Aktivität in seneszenten Blättern zu verzeichnen ist, soll die Bedeutung der XDH anhand des Vorganges der Seneszenz näher erläutert werden.

Die Seneszenz stellt das Endstadium der Blatt-Entwicklung dar und ist ein Typ des PCDs. Die Mehrzahl der pflanzlichen Gene wird während der Seneszenz herunterreguliert. Bisher wurden ca. 30 Gene in *A. thaliana* entdeckt, die in seneszenten Blättern transkriptionell hochreguliert werden und als Seneszenz-assoziierte Gene (SAG) bezeichnet werden (Lim et al., 2003). Die Hauptaufgabe dieser Gene liegt in der Zell-Degeneration und Remobilisierung von Nährstoffen, bekannte Vertreter sind degradative Enzyme wie RNasen (Taylor et al.,

1993), Proteinasen (Lohmann *et al.*, 1994; Drake *et al.*, 1996) und Lipasen (Ryu u. Wang, 1995). Außerdem erfordern oxidative Prozesse während der Seneszenz, insbesondere die Einleitung des PCDs, die Bildung von ROS.

Die XDH in *A. thaliana* ist in der Lage, beide Funktionen zu erfüllen. Einerseits ist eine erhöhte XDH-Aktivität für den Purinabbau, also die Remobilisierung von Kohlenstoff und Stickstoff erforderlich. Andererseits kann eine weit über das übliche Maß hinaus aktivierte XDH für die Bereitstellung von Superoxidradikalen sorgen und damit den PCD vermitteln. Superoxidradikale sind geladen und können daher biologische Membranen nicht passieren, während Wasserstoffperoxid als ungeladenes Molekül eine Signalfunktion über weitere Strecken erfüllen kann. Da für *A. thaliana* die Einleitung des PCDs in Abhängigkeit von Superoxidradikalen nachgewiesen wurde (Jabs *et al.*, 1996), ist in diesem Zusammenhang die subzelluläre Lokalisierung der Superoxidquelle und damit der XDH von Bedeutung. Diesbezüglich existieren widersprüchliche Daten, die von einer cytoplasmatischen Lokalisierung (Datta *et al.*, 1991) bis zur Beschreibung einer löslichen peroxisomalen XO (Sandalo *et al.*, 1988) reichen. Die bisher bekannten Superoxid-bildenden Enzyme, insbesondere die NADPH-Oxidasen, sind hauptsächlich im Cytosol lokalisiert (Overmyer *et al.*, 2003). Dies könnte für eine cytosolische Lokalisierung auch der XDH sprechen; eine entsprechende Untersuchung steht jedoch noch aus.

Eine weitere für die Vermittlung des PCDs notwendige Substanz ist Stickstoffmonoxid (NO), das einerseits als Signalmolekül fungiert und andererseits direkt an der Auslösung des PCDs beteiligt ist (Durner u. Klessig, 1999). Außerdem entsteht während der oxidativen Prozesse aus NO und $O_2^{\cdot -}$ Peroxinitrit ($ONOO^{\cdot -}$), das ebenfalls den PCD induziert. Die Bildung von NO in Säugetieren erfolgt hauptsächlich durch die NO-Synthase, darüberhinaus ist eine XO-vermittelte NO-Produktion beschrieben (Godber *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004). In Pflanzen konnte bisher eine NO-Bildung durch die NR (García-Mata u. Lamattina, 2003) sowie durch eine spezifische pflanzliche NO-Synthase AtNOS1 (Guo *et al.*, 2003) nachgewiesen werden. Die eigenen Untersuchungen belegen jedoch, dass die AtXDH1 nicht in der Lage ist, NO zu produzieren. Dennoch könnte der XDH in diesem Zusammenhang mit der Neutralisierung von Peroxinitrit durch Harnsäure eine funktionelle Bedeutung zukommen. In *A. thaliana* konnte durch die Gabe von Harnsäure, das Endprodukt der XDH-Reaktion, die Auslösung eines Peroxinitrit-vermittelten PCDs reduziert werden (Alamillo u. Garcia Olmeedo, 2001). Insofern wäre eine Regulation der oxidativen Prozesse durch die XDH in beide Richtungen denkbar. Die genaue Funktion der XDH in diesem komplexen Regulationssystem ist noch nicht geklärt, dennoch scheint festzustehen, dass die stark aktivierte XDH im PCD eine wichtige Rolle spielt.

3.4.6 Ausblick

Die pflanzliche XDH in *A. thaliana* erfüllt neben der grundlegenden Aufgabe der Purindegradation weitere Funktionen und ist in Stress-abhängige Reaktionen involviert. Um hinsichtlich dieser physiologischen Bedeutung der XDH für die Pflanze mehr Klarheit zu erlangen, müssten die Untersuchung der XDH-Aktivität unter verschiedenen Bedingungen ausgeweitet sowie der Einfluss einer Inhibierung der XDH in der Pflanze analysiert werden. Außerdem bleibt zu prüfen, ob die XDH auch in *A. thaliana* an der HR beteiligt ist. Für die weitere Erforschung der XDH-Regulation bieten sich außerdem die mit Promotor-GUS Konstrukten transformierten *A. thaliana* Pflanzen an, die ein geeignetes Werkzeug für die quantifizierbare Untersuchung der XDH-Genexpression darstellen.

Unsicherheit herrscht bisher hinsichtlich der subzellulären Lokalisierung der XDH in *A. thaliana*. Die eigenen Daten deuten auf eine mögliche Lokalisierung in bzw. assoziiert mit Peroxisomen hin. Da es sich nur um ein einmaliges Experiment handelte, bedarf es hier weiterer Untersuchungen. Sie erscheinen auch deshalb nahe liegend, weil in den Wurzelknöllchen der Kuhbohne (*V. unguiculata*) die XDH mittels immunologischer Untersuchungen im Elektronenmikroskop als cytosolisches Enzym nachgewiesen wurde (Datta *et al.*, 1991). Für die Arbeit mit GFP-Fusionskonstrukten sollten daher weitere Systeme getestet werden, wie beispielsweise stabile Linien statt transienter Expression, die Verwendung von Protoplasten als Rezipient sowie der Einsatz anderer Promotoren an Stelle des benutzten sehr starken 35S-Promotors.

Im Gegensatz zu den meisten bislang untersuchten Organismen besitzt *A. thaliana* zwei XDH-Gene, die beide exprimiert werden. Entsprechend der Untersuchung von AtXDH1 bieten sich die rekombinante Überexpression und anschließende biochemische Charakterisierung auch der AtXDH2 an, um eventuelle funktionelle Unterschiede aufzeigen zu können. Da durch molekulare Analyse die AtXDH-ko Linien als tatsächliche XDH-„knock out“ Mutanten verifiziert werden konnten, steht mit beiden Linien geeignetes Pflanzenmaterial für weitere Untersuchungen der Funktionsweisen von AtXDH1 und AtXDH2 zur Verfügung.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Standard-Lösungen, Puffer und Medien wurden nach Sambrook *et al.* (1989) mit deionisiertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert der Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, mit HCl oder NaOH eingestellt. Medien, Medienstammlösungen und –zusätze wurden durch Autoklavieren (20 min, 1 bar, 121 °C) oder Sterilfiltrieren (0,2 µm) sterilisiert.

4.1.2 Verwendete Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen BIO-Rad, Duchefa, Fluka, Merck, Riedel de Haen, Roth, Serva und Sigma bezogen. Restriktionsendonukleasen sowie DNA- und Protein-modifizierende Enzyme stammten von den Firmen Sigma, Stratagene, Promega, Gibco/Brl Life Technologies, MBI fermentas und New England Biolabs.

4.1.3 Bakterien- und Hefe-Stämme

Stamm	Referenz	Genotyp	Kultivierung/Verwendung
Escherichia coli			
DH5α	Hanahan (1983)	<i>supE 44Δlac U169 (Δ80lacZ ΔM15) hsd R17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA</i>	LB, 37°C/Klonierung
TP 1000	Palmer <i>et al.</i> (1996)	<i>F' Δlac U169 araD139 rpsL150 relA1 ptsF rbsR flbB Δ(mob-AB)</i>	LB, 37°C/Expression
Agrobacterium tumefaciens			
C58C1	Chilton und Chilton (1984)	residentes Plasmid pMP90	CPY + rif + gent, 28°C/Transformation von <i>A. thaliana</i>
Pichia pastoris			
KM71	Invitrogen	<i>arg4 his4 aox1::ARG4</i>	YPD, 30°C/Expression der <i>AtXDH1</i> -cDNA

4.1.4 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Referenz	Selektion	Verwendung
pGEM-T Easy	Promega	amp, Blue-White	PCR-Klonierung
pBluescript II SK+	Stratagene	amp, Blue-White	Klonierung, Sequenzierung
pMP90	Deblaere <i>et al.</i> (1985)	gent	trägt <i>vir</i> -Gene in C58C1
pBin19	Bevan (1984)	kan; Blue-White	Transformation in <i>A. thaliana</i>
pPICZA	Invitrogen	zeocin	Überexpression in <i>P. pastoris</i>
pTrcHis	Temple <i>et al.</i> (2000)	amp	Überexpression in <i>E. coli</i>
pCK GFP	Reichel <i>et al.</i> (1996)		2x 35S-Expressions-Kassette
pRT99	Töpfer <i>et al.</i> (1987)	amp	Transformation in <i>Z. mays</i>
pRT103	Töpfer <i>et al.</i> (1987)	amp	Promotor-GUS-Analyse
pBS GFP C-Fus	Nowak (2004)	amp	Lokalisierung
pBS GFP N-Fus	Nowak (2004)	amp	Lokalisierung

Diese Plasmide bilden die Grundlage aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-Konstrukte und deren Subklone (siehe jeweilige Kapitel).

4.2 Molekularbiologische Arbeiten

4.2.1 Klonierungstechniken

Die Arbeit mit rekombinanter DNA auf Plasmidebene umfasst jegliche Neukombination von DNA und dient der Klonierung von PCR-Fragmenten und der Expression von Genen in verschiedenen Organismen.

Der Einsatz sämtlicher DNA-modifizierenden Enzyme, wie Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase und alkalische Phosphatase, erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller oder nach Sambrook *et al.* (1989). Die Transformation von Plasmid-DNA und Ligationsansätzen in *E. coli* sowie die Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen erfolgte ebenfalls nach Sambrook *et al.* (1989). Plasmid-DNA Minipräparationen wurden, je nach späterer Verwendung, entweder mit Hilfe der CTAB-Methode nach Del Sal (1989), der alkalischen Lyse nach Sambrook *et al.* (1989) oder mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid-Kits von Macherey & Nagel durchgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen erfolgte ebenfalls nach Sambrook *et al.* (1989), DNA aus Agarosegelen wurde den Angaben der Hersteller entsprechend mit dem Easy-Pure™ Kit von Biozym oder dem NucleoSpin® Extract-Kit von Macherey & Nagel aufgereinigt.

4.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Standard-PCR-Protokoll nach Sambrook et al. (1989) wurde den Anforderungen entsprechend abgewandelt. So wurde für die Erstellung von Expressionskonstrukten die Pwo-DNA-Polymerase (Peqlab) verwendet, während bei einfachen Nachweis-Reaktionen die Taq-Polymerase (Peqlab) Verwendung fand. Für RT-PCR Experimente wurde, wenn erforderlich, ein Gemisch aus Taq- und Pwo-Polymerase (Peqlab) im Verhältnis 24:1 (units) eingesetzt. Sämtliche PCR-Experimente wurden mit Hilfe des Thermocycler Gen Amp PCR-System 2400 von Perkin-Elmer bzw. des PCR-Express Gradient von Hybaid durchgeführt. Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer befindet sich im Anhang.

PCR-Mutagenese

Für die Erzeugung aller Expressionskonstrukte war es notwendig, mit Hilfe von mutagenisierenden Primern neue Restriktionsstellen in die cDNA einzubringen. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl in Gegenwart von 1 µM eines jeden Primers, 200 mM eines jeden Nukleotides, 20-50 ng Template-DNA und 2,5 U Pwo-DNA-Polymerase. Die Amplifikation erfolgte während 15-20 Zyklen, wobei einzelne Parameter wie Zyklenzahl, Annealingtemperatur und -dauer sowie Elongationszeit den jeweiligen Bedingungen angepasst wurden. Das Standard-Protokoll für die Amplifikation von rekombinanter AtXDH setzte sich folgendermaßen zusammen: einmalige Denaturierung bei 94 °C für 2 min; 15-20 Zyklen bestehend jeweils aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 55 °C und 4 min Elongation bei 72 °C; sowie eine abschließende Endsynthese bei 72 °C für 7 min.

Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

In einer RT-Standardreaktion wurden dazu 2-6 µg Gesamt-RNA bzw. 50-100 ng mRNA eingesetzt. Diese wurde zunächst 3 min bei 65 °C denaturiert bevor 5 µM Oligo-dT Primer, 20 U RNase-Inhibitor (rRNasin®, Promega), 500 mM eines jeden dNTPs und 10 U AMV-Reverse Transkriptase zu dem Gesamtansatz von 20 µl gegeben wurden. Die RT-Reaktion fand für 2 h bei 41 °C statt und wurde anschließend abgestoppt durch auffüllen mit TE-Puffer auf 250 µl. Die nachfolgende PCR wurde durchgeführt mit 0,5-3 µl der RT-Reaktion als Template, 2 µM jedes spezifischen Primers, 200 mM jeden dNTPs, 1,5 U Taq-Polymerase oder Taq/Pwo-Gemisch in Gegenwart von 2,5 mM MgCl₂ (10x Puffer für hohe Erträge, Peqlab) und 1 µl Enhancer-Lösung (Peqlab) in einem Endvolumen von 25 µl. Für die Amplifikation wurde das Standardprotokoll den jeweiligen Ansprüchen angepasst. Parallelproben wurden in einem Gradienten von unterschiedlichen Annealing-Temperaturen zwischen 50 °C und 65 °C in bis zu 50 Zyklen eingesetzt. Da in Gegenwart von Taq-Polymerasen hergestellte PCR-Amplifikate einen 3'-Adenin-Überhang besitzen, wurden RT-PCR Produkte direkt in

sogenannte TA-Vektoren mit kompatibelem Thymin-Überhang wie pGEM-T Easy™ (Promega) kloniert.

Für semiquantitative RT-PCR wurden grundsätzlich 2 µg *A. thaliana* Gesamt-RNA revers transkribiert. Von dieser RT-Reaktion wurden 3 µl für folgende PCR mit XDH1- und XDH2-spezifischen Primern eingesetzt: 3 min Anfangsdenaturierung, 30 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 56°C, 1 min Elongation bei 72°C; sowie 6 min Endsynthese bei 72°C.

Inverse PCR

Diese PCR diente der molekularen Charakterisierung der T-DNA getaggten XDH-Mutanten. Für jede iPCR wurden zunächst 100 ng genomische DNA mit den jeweils geeigneten Restriktionsenzymen vollständig verdaut, aufgereinigt und anschließend in 200 µl Gesamtvolumen ligiert. Nach einer erneuten Aufreinigung der DNA wurde eine einfache PCR durchgeführt, wobei mit Hilfe der T-DNA spezifischen Primer die flankierenden genomischen Bereiche amplifiziert wurden.

Analytische PCR

Bei der Analyse transgener *P. pastoris*-Linien diente ein Zell-Rohextrakt (Miles *et al.*, 1998) als Template für eine Standard-PCR. Spezifische Primer ermöglichten so die Amplifikation des eingebrachten Fremdgenes.

4.2.3 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde hochreine über DNA-Isolationskits isolierte Plasmid-DNA (NucleoSpin Plasmid, Macherey & Nagel) oder PCR-Amplifikat-DNA (NucleoSpin Extract, Macherey & Nagel) eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von fluoreszenz-markierten ddNTPs des ABI-Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer) mit einem Pop 6 Polymer auf einem ABI-Prism™ 310 cycle sequencer (PE Applied Biosystems).

4.2.4 Gesamt-DNA-Isolation aus *A. thaliana* (modifiziert nach Saghai-Mahoof *et al.*, 1984)

Für Gesamt-DNA-Isolation wurde 1 g Blattmaterial von *A. thaliana* in flüssigem Stickstoff sehr fein gemörsert. Nach Zugabe von 1 ml auf 65°C vorgewärmtem 2x-CTAB-Puffer [200 mM Tris/HCl pH 7,5; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB (w/v); 2% β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)] wurde vorsichtig gemischt; weitere 1,5 ml vorgewärmter 1x-CTAB-Puffer wurden zugegeben und der Ansatz wurde nach kräftigem Vortexen für 1,5 h im Hybridisie-

rungssofen (Biometra OV-1) bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT folgte eine Extraktion mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24/1), bevor die Oberphase mit 50 µl RNase (10 mg/ml) versehen und 30 min bei RT inkubiert wurde. Durch Zugabe von 0,6 Vol Isopropanol erfolgte die Fällung der DNA; die sich bildende Flocke wurde mit einer Glaskapillare aufgewickelt und für 20 min in 76%igem Ethanol/200 mM NaAcetat gewaschen. Nach Abspülen mit eiskaltem 76%igem Ethanol/10 mM NH₄Acetat wurde die DNA getrocknet und anschließend bei 4 °C in 200 µl TE gelöst.

4.2.5 Gesamt-RNA Isolation aus *A. thaliana*

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. thaliana* erfolgte entweder mit Hilfe des NucleoSpin® RNA Plant-Kits (Macherey & Nagel) oder nach Logemann *et al.* (1987). Dazu wurde das Material in flüssigem Stickstoff sehr fein gemörst und mit 2 Vol RNA-Extraktionspuffer [20 mM MES pH 7,0; 8 M Guanidinhydrochlorid; 20 mM EDTA in DEPC-H₂O (5 µl/ml β-Mercaptoethanol frisch zugeben)] versetzt (mind. 2 ml). Sobald das Gewebe angetaut war, wurde es in zwei vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 15000 upm und 4 °C abzentrifugiert. Die Überstände wurden auf drei neue vorgekühlte Reaktionsgefäße verteilt, und es erfolgte eine Extraktion mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1, v/v/v). Der wässrigen Oberphase wurden 1/20 Vol 1 M Essigsäure und 0,7 Vol 96% EtOH zugegeben, leicht geschüttelt und die RNA wurde für mind. 30 min bei 4 °C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (15000 upm, 10 min, 4 °C) wurde das Pellet zweimal mit 1 Vol 3 M NaAcetat, pH 5,2 gewaschen. Entsprechend erfolgte ein Waschschriff mit 1 Vol 70%igem EtOH, anschließend wurde das Pellet in 50–100 µl DEPC-H₂O gelöst.

4.3 Proteinbiochemische Arbeiten

4.3.1 Aufreinigung von His-Tag Proteinen

Für die Aufreinigung rekombinant exprimierter His-Tag Proteine wird die Bindung von Polyhistidin-Resten an eine Nickel-Nitrilotriacetat (Ni-NTA) Superflow Matrix (Qiagen) genutzt. Alle Arbeiten erfolgten bei 4 °C. Nach Herstellung des Proteinrohextraktes aus *P. pastoris*, *E. coli* oder *N. tabacum* wurde dieser mit einem entsprechenden Volumen der im jeweiligen Extraktionspuffer äquilibrierten Ni-NTA Matrix (Bindungskapazität: 10 mg/ml) versetzt und 15 min geschwenkt. In einer dem verwendeten Volumen angemessenen Tropfsäule wurde mit dem fünffachen Matrixvolumen Waschpuffer (50 mM NaP_i pH 6,0; 300 mM NaCl; 10% Glycerin; 20 mM Imidazol) gewaschen, und anschließend das His-getaggte Protein durch sechsmalige Zugabe von 0,7 Matrixvolumen Elutionspuffer (50 mM NaP_i, pH 6,0; 300 mM NaCl; 10% Glycerin; 500 mM Imidazol) eluiert. Aliquots jeder Fraktion wurden in der SDS-PAGE

bzw. im nativen Aktivitätsgel analysiert. Die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen wurden gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA dialysiert bzw. bei kleinem Fraktionsvolumen mittels Sephadex G-25 PD10 entsalzt.

4.3.2 Anionentauscher-Chromatographie

Zur weiteren Proteinaufreinigung wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Source™15Q XK 16-Säule mit 10 ml Matrixvolumen und eine Niederdruck-Chromatographieranlage (FPLC, Amersham Pharmacia) verwendet. Die in 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 2 mM DTT äquilibrierte Säule wurde mit 10-15 mg Protein beladen; die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten über 4 Säulenvolumen von 0-50% des genannten Puffers plus 1 M NaCl. Fraktionen von je 1 ml wurden aufgefangen und Aliquots in der SDS-PAGE analysiert.

4.3.3 Gelfiltration

Für die Molekulargewichtsbestimmung wurde in dieser Arbeit eine Superdex 200 HR 10/30 Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia) in Verbindung mit einer Niederdruck-Chromatographieranlage (ÄKTA basic, Amersham Pharmacia) eingesetzt. Die in 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 200 mM NaCl äquilibrierte Säule wurde mit 200 µl Probe (0,8-1,3 mg Protein) beladen und die Proteine wurden bei einer Flussrate von 0,3 ml/min separiert. Anhand einer Eichgerade aus Proteinen bekannter Größe kann das Molekulargewicht der gewünschten Proteine nach folgender Formel berechnet werden:

$$y = 1E + 0,8e^{-0,5538x} \quad (x: \text{Elutionsvolumen in ml; } y: \text{Molekulare Masse in Da})$$

Für das Entsalzen kleinerer Volumina bis 400 µl bzw. 2,5 ml wurden vorgepackte Sephadex G-50 Nick-Säulen bzw. Sephadex G-25 PD-10 Tropfsäulen (beide Amersham Pharmacia) verwendet. Die Säulen wurden jeweils mit 5 Säulenvolumen des gewählten Puffers äquilibriert, mit der Probe beladen und die Differenz zum maximalen Probenvolumen an Puffer zugegeben. Die umgepufferte Proteinfraktion wurde mit dem 1,4 fachen Volumen des Probenvolumens eluiert.

4.3.4 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Ankonzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe von Zentrifugations-Konzentratoren. Für kleine Volumina bis 4 ml wurden Centricon-, für bis zu 15 ml Centriprep-Konzentratoren (beide Amicon) mit einem Ausschlussvolumen von 50 kDa entsprechen den Angaben des Herstellers eingesetzt.

4.3.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes eines Rohextrakts erfolgte nach Bradford (1976) unter Verwendung von BSA (Rinder-Serum-Albumin Fraktion V) als Standard. Ein Aliquot von 5 µl des Rohextraktes wurde in 800 µl H₂O verdünnt, mit 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad; Roth) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert bevor die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer bestimmt wurde.

Die Konzentration gereinigter Proteine wurde mit Hilfe des kalkulierten molaren Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichts durch eine Absorptionsbestimmung bei 280 nm am Spektralphotometer nach Gill und Hippel (1989) ermittelt.

4.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinfractionen entsprechend ihres Molekulargewichtes wurden in dieser Arbeit diskontinuierliche Tris/Glycin-SDS-Gelsysteme zwischen 7,5% und 12,5% nach Laemmli (1970) verwendet. Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden dazu mit 5x SDS-PAGE-Ladepuffer (50% Glyzerin; 3,5% SDS; 15% β-Mercaptoethanol; 0,02% Bromphenolblau) versetzt und für 5-7 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte unter Wasserkühlung bei 150-200 V. Im Anschluss daran erfolgte eine Visualisierung der aufgetrennten Proteine im Gel über eine Färbung mit Coomassie-Lösung.

4.3.7 Immunblot-Analyse

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Gele für ca. 5 min in Transferpuffer (10% MeOH in 1x Tris/Glycin) äquilibriert. Für den Transfer der Proteine in einem diskontinuierlichen semi-dry-Blot auf die Trägermembran (HybondTM-P, Amersham Pharmacia) wurden 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier luftblasenfrei auf die Anode gelegt, darauf wurde die mit MeOH benetzte, mit H₂O gewaschene und in Transferpuffer äquilibrierte Membran aufgebracht. Anschließend folgten das Gel, 3 Lagen Whatman-Papier und die Kathode. Das Blotten erfolgte bei 250 mA mit 3 mA/cm². Nach Waschen des Blots in 1x TBS-Lösung (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) können die transferierten Proteine reversibel mit PonceauS-Lösung (5% in 1x TBS) angefärbt werden.

Für den immunologischen Nachweis transferierter Proteine wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockierungslösung (2% BSA in 1x TBS) inkubiert bevor der 1:1000 in TBS verdünnte primäre Antikörper zugegeben wurde. Nach ca. 2-stündigem Schwenken bei RT wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch 15-minütiges Waschen der Membran in TBS-T (0,1% Tween20 in 1x TBS) und Waschen für 10 min in 0,8% NaCl entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper Anti-Maus-IgG (Sigma) für 1 h bei RT unter Schwenken. Nach erneutem Waschen mit TBS-T

und 0,8% NaCl folgte die Färbereaktion der alkalischen Phosphatase durch eine Benetzung der Membran mit ca. 5 ml BCIP/NBT-Reaktionslösung, bestehend aus 33 µl NBT (Promega) und 16 µl BCIP (Promega) in 100 mM Tris/HCl pH 8,8; 100 mM NaCl; 6,4 mM MgCl₂. Durch Entfernen der Färbelösung und Waschen mit Wasser wurde die Reaktion gestoppt.

In dieser Arbeit wurde als primärer Antikörper der monoklonale Anti-His-Tag Antikörper aus Maus (Dianova) für die Arbeiten mit rekombinanten His-getaggten Proteinen verwendet.

4.3.8 Expression von ABA3 in *E. coli*

Die rekombinante Überexpression der Moco-Sulfurase ABA3 aus *A. thaliana* in *E. coli* erfolgte nach Bittner *et al.*, 2001.

4.4 Nachweis von Enzymaktivitäten

4.4.1 Fluorimetrischer β -Glucuronidase (GUS) Aktivitätstest

Die Untersuchung der mit Promotor-GUS-Konstrukten transformierten *A. thaliana*-Pflanzen hinsichtlich ihrer GUS-Aktivität erfolgte mit Hilfe des fluorimetrischen Nachweises nach Jefferson *et al.* (1987). Dafür wurden 80 mg Pflanzenmaterial mit 120 µl Extraktionspuffer (100 mM NaH₂PO₄; pH 7,8 mit NaOH; 1 mM DTT) versetzt, gequetscht und auf Eis gestellt. Nach einer Behandlung im Ultraschallbad für 2x 15 s wurden die Zellbestandteile für 15 min bei 14000 upm und 4°C abzentrifugiert. Von diesem Rohextrakt wurden 50 µl mit 450 µl MUG-Reaktionspuffer (50 mM NaP_i pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,1% Triton X-100; 0,4% Sarkosyl; 0,04% MUG; 0,1% β -Mercaptoethanol) gemischt, sofort 50 µl als Nullwert entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 950 µl 200 mM Na₂CO₃ abgestoppt. Der restliche Reaktionsansatz inkubierte bei 37°C; jeweils nach 10, 20 und 30 min wurden 50 µl entnommen und ebenso abgestoppt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei 455 nm nach Anregung bei 365 nm am Luminescence Spectrometer LS 30 (Perkin Elmer).

4.4.2 In Gel-Aktivitätsnachweise (nach Mendel u. Müller, 1976)

Zum Nachweis der Aktivitäten von AO und XDH in pflanzlichen Geweben wurde zunächst ein Rohextrakt aus 50-100 mg Pflanzenmaterial hergestellt. Nach Zugabe von 1 Vol Extraktionspuffer (100 mM KaP_i pH 7,5; 2,5 mM EDTA; 5 mM DTT) wurde das Material gequetscht, zweimal für je 2 min ultrabeschallt und anschließend für 15 min bei 15000 upm und 4°C abzentrifugiert. Von diesem Rohextrakt wurden 50-100 mg pro Spur mit 1/10 Vol Ladepuffer [50% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau (w/v)] versetzt und in einem nativen 7,5%igen PA-Gel bei 100-150 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zum Nachweis von Aktivitäten rekombinanter XDH wurde 1 µg Protein pro Spur aufgetragen.

Anschließend wurden die Gele für 20 min in 100 mM K_2HPO_4 pH 7,5 für AO-Aktivität bzw. in 250 mM Tris/HCl pH 8,5 für XDH-Aktivität äquilibriert, bevor die Färbelösung (300 μM Substrat, 100 μM PMS und 400 μM MTT im jeweiligen Puffer) zugegeben und das Gel über Nacht inkubiert wurde. Als Substrate wurden üblicherweise Abscisinaldehyd, Indol-3-carbaldehyd, 1-Naphthaldehyd oder Heptaldehyd für AO-Nachweise bzw. Xanthin oder Hypoxanthin für den Nachweis der XDH-Aktivität eingesetzt. Die Färbereaktion wurde abgestoppt durch Waschen der Gele in Wasser.

4.4.3 Spektrophotometrische Bestimmung der XDH-Aktivität

Der Nachweis der Aktivität rekombinanter XDH erfolgte entweder mit NAD^+ als Elektronenakzeptor durch Quantifizierung des gebildeten NADH oder durch Bestimmung der Harnsäure-Produktion. Die zweite Methode ermöglicht nicht nur den Einsatz von NAD^+ sondern auch die Verwendung von O_2 als Elektronenakzeptor.

Bestimmung der XDH-Aktivität mittels NADH

Der Reaktionsansatz enthielt 1 mM Hypoxanthin oder Xanthin in 1 ml Gesamtvolumen, 1 mM NAD^+ sowie eine geeignete Menge Enzym in 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA. Durch Zugabe des Enzyms wurde die Reaktion gestartet und über 1 min die Zunahme der OD bei 340 nm verfolgt. Gebildetes NADH lässt sich mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{NADH } 340\text{nm}} = 6,178 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ quantifizieren.

Bestimmung der XDH-Aktivität mittels Harnsäure

Bei diesem Ansatz befanden sich 1 mM Xanthin, eine geeignete Enzymmenge sowie ggf. 1 mM NAD^+ in einem Gesamtvolumen von 1 ml im oben angegebenen Puffer. Nach dem Start der Reaktion wurde die Zunahme der OD bei 295 nm über 1 min beobachtet und mittels $\epsilon_{\text{Harnsäure } 295\text{nm}} = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ die gebildete Harnsäure quantifiziert.

4.4.4 Nachweis von Superoxid-Radikal-Bildung

Die Bestimmung gebildeter Superoxid-Radikale erfolgte nach McCord u. Fridovich (1968) bzw. Ballou *et al* (1969) durch den Nachweis $\text{O}_2^{\cdot-}$ -abhängiger Cytochrom c Reduktion. In einem Versuchsansatz von 1 ml befanden sich 1 mM Substrat, 16,7 μM Cytochrom c und rekombinante XDH in 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; die Absorptionssteigerung bei 550 nm wurde über 1 min verfolgt. Die gleiche Reaktion wurde in Gegenwart eines Superoxid-Dismutase-Überschusses durchgeführt, die ermittelte Absorptionsveränderung bei 550 nm wurde von dem zuvor ermittelten Wert ohne SOD subtrahiert, um so die $\text{O}_2^{\cdot-}$ -

abhängige Reduktion von Cytochrom c (mit $\epsilon_{\text{red. Cyt c } 550\text{nm}} = 20 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) errechnen zu können.

4.4.5 Bestimmung von Stickstoffmonoxid

Die Produktion von NO durch die XDH wurde mit Hilfe des Chemilumineszenz NO Analyzers CLD AL ppt 770 (Eco-Physics) nach Rockel *et al.* (2002) untersucht. In 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA wurden 0,2 mM Nitrit und 0,5 mM Xanthin vorinkubiert, um eine chemische NO-Bildung auszuschließen. Bis zu einem Gesamtvolumen von 1 ml wurde 50-1000 µg rekombinante XDH zugegeben und die NO-Produktion während 15 min verfolgt. Als Positivkontrolle wurde 10 mU Mais-Nitratreduktase (Sigma) zugegeben.

4.4.6 *In vitro*-Sulfurierung der XDH durch ABA3

Vor der eigentlichen Sulfurierung erfolgte ggf. eine Desulfurierung der rekombinanten XDH. Dazu wurden 10-500 µg Enzym in Gegenwart von 50 mM KCN für 1 h bei RT inkubiert und anschließend mittels PD10 in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 umgepuffert und so von Cyanid und gebildetem Thiocyanat getrennt.

Die *in vitro*-Sulfurierung erfolgte in einem Volumen von 200-400 µl in 50 mM Tris/HCl pH 8,0, wobei 10-60 µg partiell aktive oder inaktivierte XDH mit dem dreifachen Überschuss an ABA3 in Gegenwart von 1 mM L-Cystein für 1 h bei 30°C inkubiert wurden. Aliquots der so behandelten Enzyme wurden im nativen Gel oder spektrophotometrisch auf ihre Aktivität getestet.

4.5 Kultur von *A. thaliana*

Die in dieser Arbeit verwendeten Wildtypen *A. thaliana* L., cv. Columbia (Col-0) und Landsberg erecta (Le) sowie die *aba3*-Mutante *A. thaliana* L., cv. Le *aba3.2* lagen bereits vor. Eine T-DNA getaggte XHD1 Mutante, die GABI-Kat Linie 049D04 wurde freundlicherweise von Bernd Weißhaar vom MPI für Züchtungsforschung in Köln zur Verfügung gestellt. Die SALK Linie 015081, eine T-DNA getaggte XDH2 Mutante, konnte über das Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) bezogen werden.

4.5.1 Pflanzenanzucht

In gut durchnässter Aussaaterde wurden 20-100 *A. thaliana*-Samen in Pflanztöpfen ausgebracht. Die Töpfe wurden mit Frischhalte-Folie abgedeckt und nach einer 1-2 Tage dauernden Keimungsinduktion bei 4°C in einen Kulturschrank AR-36L Arabidopsis growth chamber (Percival Scientific) mit definierten Anzuchtbedingungen überführt. Die Kultivierung erfolgte

bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75% und zunächst für ca. 2 Wochen unter Langtagbedingungen, d.h. 16 h Lichtphase bei 22°C und 8 h Dunkelphase bei 20°C. Sobald die jungen Pflanzen ein kräftiges Rosettenstadium erreicht hatten, wurden die Bedingungen auf 9 h Lichtphase bei 22°C und 15 h Dunkelphase bei 20°C geändert.

4.5.2 Sterilisation von *A. thaliana*-Samen

Um *A. thaliana*-Samen *in vitro* auf MS-Medium zur Keimung zu bringen, müssen die Samen zunächst sterilisiert werden. Ca. 500 Samen wurden dazu in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 750 µl zimmerwarmem 70% EtOH überschichtet, gemischt und 2-3 min inkubiert. Sobald sich die Samen vollständig wieder am Boden abgesetzt hatten, wurde der EtOH abgezogen, und zu den Samen wurden 750 µl 5% Na-Hypochloritlösung (NaOCl) mit 1/1000 Volumen 10% Triton X-100 gegeben. Dieser Ansatz wurde für 5 min unter gelegentlichem Schütteln inkubiert und ein zweites Mal wiederholt. Um das NaOCl zu entfernen, wurden die Samen nun 5x mit jeweils 750 µl sterilem dest. H₂O gewaschen und anschließend entweder sofort ausgebracht oder einige Tage in sterilem Wasser bei 4°C gelagert.

4.6 Erzeugung transgener Pflanzen

4.6.1 Vorbereitung von *A. tumefaciens* für indirekten Gentransfer

Die Klonierung eines für die Transformation geeigneten T-DNA Vektors – in dieser Arbeit wurde der Binärvektor pBIN19 (Bevan, 1984) verwendet – erfolgte in *E. coli*. Anschließend wurden die fertiggestellten Vektoren direkt in den Agrobakterien Stamm C58C1 transformiert. Die Herstellung der kompetenten Agrobakterien und die Transformation erfolgten nach Höfgen u. Willmitzer (1988).

Kontrolle der Transformation von *A. tumefaciens*

Die erhaltenen Agrobakterien-Klone wurden vor der weiteren Verwendung überprüft, um DNA-Verluste auf Grund von Neu-Arrangements ausschließen zu können. Dazu wurde aus 5 ml Übernachtskultur mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid-Kits von Macherey & Nagel Plasmid-DNA isoliert, in *E. coli* retransformiert und einer Restriktionskontrolle unterzogen.

4.6.2 Vakuuminfiltration von *A. thaliana* (modifiziert nach Bechthold *et al.*, 1993)

Zunächst wurden die zur Transformation bestimmten Pflanzen im Alter von ca. 2 Wochen auf 5-8 Pflanzen pro Topf vereinzelt. Nach weiteren 3 Wochen unter Kurztagsbedingungen wurden die Pflanzen dekapitiert und 2-5 Tage später transformiert.

Für die Vakuuminfiltration wurden 5 ml CPY (0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 1 g/L Hefeextrakt; 5 g/L Caseinpepton; 5 g/L Saccharose; pH 7,0 mit NaOH) mit entsprechenden Antibiotika mit einem Agrobakterienklon beimpft und für 2 Tage bei 28°C geschüttelt. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurde anschließend eine 400 ml CPY (+Antibiotika) Großkultur beimpft und für 24 h bei 28°C bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,8$ geschüttelt. Die Agrobakterien wurden abzentrifugiert (4000 upm, 15 min, RT), in 200 ml Infiltrations-Medium [1/2 MS (Murashige-Skoog, 1962) mit 50 g/L Saccharose; 0,5 g/L MES; 0,044 μM BAP; 0,05% Triton X-100; pH 5,7 mit KOH] aufgenommen und gründlich suspendiert. Anschließend wurde die Agrobakterien-Suspension in ein 600 ml-Plastikbecherglas (Nalgene) überführt. Die zu transformierenden Pflanzen wurden kopfüber in das Becherglas mit der Agrobakterien-Suspension geklemmt, so dass sie gerade eben in die Suspension eintauchten. In einem Exsikkator wurde für 15 min bei der ersten, für 10 min bei allen weiteren Pflanzen ein schwaches Vakuum von ca. 100 hPa angelegt, wodurch die Interzellularen der pflanzlichen Meristeme entgast werden. Anschließend wurde das Vakuum langsam aufgehoben. Durch den Druckausgleich wird die Agrobakterien-Suspension in die Interzellularen der Pflanze gesaugt.

Die Pflanzen wurden zum Abtropfen kurz auf Papier gelegt und anschließend über Nacht kopfüber in einem Petrischalenbeutel hängend bei RT mit den Bakterien kokultiviert. Zur Gewährleistung einer ausreichend feuchten Atmosphäre wurde etwas Wasser in den Beutel gefüllt. Am darauffolgenden Tag wurden die Pflanzen in einem Minigewächshaus in die Klimakammer zurückgestellt. Nach 1-2 Tagen wurden die Pflanzen aus dem Minigewächshaus herausgenommen und bis zur Samenreife (ca. 4 Wochen) unter Langtagbedingungen kultiviert.

Selektion transgener Pflanzen

Die Identifikation transgener Pflanzen erfolgt durch Selektion auf Kanamycin-Resistenz, die durch die Neomycin-Phosphotransferase vermittelt wird. Als Selektionsmedium diente 1/2 MS (Murashige-Skoog, 1962) mit 50 g/L Saccharose; 0,5 g/L MES; 8 g/L Agar und 37,5 mg/L Kanamycin. Wie unter 4.5.2 beschrieben sterilisierte Samen wurden nach dem letzten Waschschrift in 1 ml 0,15%iger steriler Agarose aufgenommen und gut gemischt. Pro Petrischale wurden ca. 200 Samen auf dem Selektionsmedium durch Auftropfen homogen verteilt. Nach dem Trocknen der Platten wurden diese für 1-2 Tage bei 4°C inkubiert bevor die Pflanzen wie unter 4.5.1 beschrieben kultiviert wurden.

Nicht-transgene Pflanzen bildeten Nekrosen aus und starben nach kurzer Zeit ab, während transgene, d.h. kanamycinresistente Pflanzen nach 10-12 Tagen 1-2 Folgeblattpaare ausgebildet hatten. Sie wurden auf ein Bewurzelungsmedium (entsprach dem Selektionsmedium mit 1,5% Agar) umgesetzt und nach weiteren 1-2 Wochen in Erde überführt.

4.6.3 Blattscheibentransformation von *N. tabacum* (nach Horsch *et al.*, 1985)

Als Empfängerorganismus dienten in dieser Arbeit *in vitro* Pflanzen von *N. tabacum* L., cv. „Gatersleben“, die auf MS-Medium (Murashige-Skoog, 1962) angezogen wurden.

Die erforderlichen Agrobakterien wurden in CPY (siehe 4.6.2) mit Antibiotika für 2 Tage bei 28 °C angeschüttelt. In Petrischalen wurden 20 ml flüssiges MS-Medium mit 400 µl der Bakteriensuspension vermischt. Ca. 1 cm² große Blattstücke der vorgesehenen *in vitro* Pflanzen wurden in die vorbereiteten Petrischalen überführt und für 2 Tage bei RT und gedämpftem Licht inkubiert. Anschließend wurden die Blattextplantate dreimal mit flüssigem MS gewaschen und auf festes Regenerationsmedium (MS mit 1 g/L Kaseinhydrolysat, 1 mg/L BAP und 0,1 mg/L NAA) mit 500 mg/L Claforan und 50 mg/L Kanamycin überführt.

Regeneration

Die Regeneration erfolgte in einem Pflanzenkulturraum bei 25 °C und einem 14 h Hell- und 10 h Dunkelrhythmus. Alle zwei Wochen wurden die Blattscheiben auf frisches Medium umgesetzt, da das zum Abtöten der Agrobakterien verwendete Claforan lichtempfindlich ist. Die nach 4-8 Wochen entstandenen Spross-Strukturen wurden auf Selektionsmedium ohne NAA umgesetzt. Bei einer Sprosslänge von ca. 1 cm wurde dieser von Blatt- und Kallusstücken getrennt und auf MS mit 1 g/L Kaseinhydrolysat überführt. Später wurden getestete transgene Pflanzen zur Saatgutgewinnung in Erde überführt.

4.6.4 Direkter Gentransfer mittels Partikelkanone

Die Partikel-Kanone ermöglicht es, DNA-Konstrukte direkt in pflanzliche Zellen zu transportieren (Sanford, 1988). Hierbei wird die DNA an Goldpartikel von 0,5-2 µm Durchmesser gebunden, die bei ausreichend starker Beschleunigung die Zellwand durchdringen und in den Kern gelangen können. Die transformierte DNA wird auch ohne stabile Integration für einige Tage exprimiert und kann als Reporter-gen-Produkt ca. 1-3 Tage nach Beschuss nachgewiesen werden. Neben dieser sogenannten transienten Genexpression besteht die Möglichkeit, dass die eingeschossene DNA ins Genom integriert und die Fremdgene stabil exprimiert werden.

In dieser Arbeit wurde *N. tabacum* L., cv. „Gatersleben“ mit GFP-XDH Fusionskonstrukten transformiert, um anhand der transienten GFP-Expression die subzelluläre Lokalisierung der XDH zu untersuchen. Außerdem wurden mit dem Ziel der stabilen XDH-Expression Suspensionskulturen von *Z. mays* L., cv. „Black Mexican Sweet“ beschossen.

Vorbereitung des Pflanzenmaterials und Coating der Goldpartikel

Die Mais-Suspensionszellen wurden auf 9 cm Rundfilterpapier ausplattiert und dieses auf festem MS-Medium mit 50 g/L Saccharose und 1 mg/L 2,4D ausgelegt. Blattscheiben mit 5 cm Durchmesser von adulten Tabakblätter wurden mit der Unterseite nach oben auf mit MS-Medium angefeuchtetem Filterpapier aufgelegt.

Das Beladen (Coating) der Goldpartikel mit DNA erfolgte – ausreichend für 6 Schuss – nach folgendem Protokoll: Drei mg Gold wurden in 100 µl 70% EtOH aufgenommen, 20 s gevortex und für 1 min auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde danach für 1 min bei 4500 upm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 50 µl H₂O resuspendiert. Nach 1 min wurde 15 s bei 500 upm ohne Bremse zentrifugiert, das Pellet in 50 µl 50% Glyzerin resuspendiert und 10 s ultrabeschallt. Der Ansatz wurde auf Eis gestellt und 5-10 µg DNA in maximal 7 µl wurden zugegeben, mit der Pipettenspitze gemischt und für 5 min auf Eis belassen. Nach Zugabe von 50 µl 2,5 M CaCl₂ wurde vorsichtig gemischt, bevor nach einer weiteren Minute 20 µl 0,1 M Spermidin zugefügt wurde und man die Partikel auf Eis 5 min absinken ließ. Es wurde 15 s bei 500 upm ohne Bremse zentrifugiert und das Pellet in 100 µl 70% EtOH aufgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit 50 µl 96% EtOH wurden die in 35 µl 96% EtOH aufgenommenen Partikel im Wasserbad für 2-3 s ultrabeschallt. Mit je 5 µl des Coatingansatzes wurden die Makrocarrier („flying discs“) beladen und 5 min unter der Sterilwerkbank getrocknet.

Transformation

Für die Transformation wurden in der Partikelkanone die Makrocarrier mit der DNA nach unten in einem Abstand von 2 cm unter der Gas-Austrittsöffnung platziert. Durch Platzen der dort befindlichen Berstscheiben beschleunigt der entweichende Heliumdruck den Makrocarrier, bis er am Fangnetz abgestoppt wird. Die mit DNA beladenen Partikel lösen sich vom Makrocarrier und treffen auf das sich unter ihnen befindende Pflanzenmaterial. Durch die Anzahl der Berstscheiben wurde der eingesetzte Druck von 700-1300 psi variiert.

Selektion und Analyse

Vier Tage nach der Transformation wurden die Filterpapiere mit den Suspensionszellen auf MS-Medium mit steigender Kanamycin-Konzentration von 250-1000 mg/L gelegt. Resistente und damit wahrscheinlich transgene Zellen wurden regelmäßig auf frisches Medium mit Kanamycin überführt und nach 3 Monaten im XDH-Aktivitätsgel getestet.

Die Analyse der mit GFP-Konstrukten beschossenen Tabak-Blätter erfolgte nach 2-3 Tagen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

4.7 Arbeiten mit *P. pastoris*

Die einzellige Hefe *P. pastoris* diene in dieser Arbeit als eukaryotisches Expressionssystem. *P. pastoris* ist als methylotrophe Hefe in der Lage, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Dabei macht das Enzym AOX1, welches Methanol unter Sauerstoffverbrauch zu Formaldehyd oxidiert, bis zu 30% aller löslichen Proteine in der Zelle aus. Der entsprechend starke und Methanol-induzierbare Promotor der AOX1 wird für die Fremdgenexpression in *P. pastoris* in Form des pPICZ-Vektor Systems (Invitrogen) genutzt.

4.7.1 Transformation von *P. pastoris*

Da der pPICZ-Vektor in *P. pastoris* nicht replizierbar ist, wurden alle Klonierungsarbeiten in *E. coli* durchgeführt. Bei der Selektion mit dem Antibiotikum ZeocinTM (Invitrogen) wurde Niedrigsalz-LB mit 5 g/L NaCl eingesetzt. Um die stabile Integration des Vektors ins Genom der Hefe zu ermöglichen, muss das pPICZ-Konstrukt vor der Transformation im Bereich des AOX1-Promotors linearisiert werden. In der Regel kommt es durch homologe Rekombination mit einem single-crossover zu einer Integration der rekombinanten DNA im 5'-Bereich des AOX1-Gens.

Die Transformation von 5-10 µg linearisierter DNA in *P. pastoris* erfolgte mittels Elektroporation entsprechend den Angaben im EasySelect *Pichia* Expressions Kit von Invitrogen. Anschließend wurden je 10, 50 und 100 µl des Transformationsansatzes auf YPDS (1% Hefeextrakt; 2% Pepton; 2% Glucose; 1 M Sorbitol; 2% Agar) mit 100 µg/ml Zeocin ausplattiert und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Zeocin-resistente Kolonien wurden mittels PCR auf Vorhandensein des entsprechenden Fremdgenes untersucht.

Um Linien mit mehrfacher Integration des gewünschten Genes zu erhalten, wurden bereits erfolgreich transformierte Zellen ein zweites Mal elektroporiert. Der Transformationsansatz wurde auf YPDS-Platten mit steigender Zeocin-Konzentration von 500, 1000 und 2000 µg/L ausplattiert, und die nach 3 Tagen entstandenen Kolonien auf Fremdgenexpression getestet.

4.7.2 Expression im Schüttelkolben

Mehrere positive Transformanten wurden zunächst in kleinen Expressionskulturen getestet. 25 ml BMGY (1% Hefeextrakt; 2% Pepton; 100 mM KPi pH 6,0; 1,34% YNB ohne Aminosäuren; 0,04% Biotin; 1% Glycerin) mit 100 µg/ml Zeocin wurden mit Zellmaterial der auf YPD (1% Hefeextrakt; 2% Pepton; 2% Glucose; 2% Agar) kultivierten Klone inokuliert und in 250 ml Schikane-Kolben bis zu einer OD₆₀₀ von 2-6 kultiviert (30 °C, 200 upm). Zur Induktion und weiteren Kultivierung wurden die Zellen bei 1000 g für 5 min abzentrifugiert und in 10 ml BMMY (entspricht BMGY ohne Glycerin, jedoch mit 0,5% MeOH) mit 0,3 mM Na-Molybdat

resuspendiert. Die Kultur erfolgte weiterhin bei 30 °C und 200 upm. Zur Überprüfung der Expression wurden in definierten Zeitabständen Proben entnommen und getestet.

Der Klon mit höchster XDH-Aktivität wurde für die Expression im größeren Ansatz ausgewählt. Die Zellen wurden in 250 ml BMGY in einem 1 L Schikanekolben für 20 h angezogen, abzentrifugiert und in 50 ml BMMY resuspendiert. Nach weiteren 10 h Kultur wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1500 g für 5 min geerntet, in Lysis-Puffer (50 mM NaP_i pH 7,4; 0,5 mM EDTA; 200 mM NaCl; 0,2 mM PMSF; 5% Glycerin) resuspendiert und bis zur Aufarbeitung bei –70 °C gelagert.

4.7.3 Bestimmung von Wachstumsparametern

Im unteren Zelldichtebereich wurde die optische Dichte bei 600 nm als Maß für die Biomassekonzentration herangezogen, da sie bis zu einer OD₆₀₀ von 25 linear mit dem Frischgewicht korreliert. Zur Bestimmung des Frischgewichts wurden 3 x 1,5 ml der jeweiligen *P. pastoris*-Kultur in vorgewogene 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und die Zellen bei 4000 g für 2 min abzentrifugiert. Für die Bestimmung des Trockengewichts wurden 10 ml einer Kultur bei 3400 g für 5 min in vorgewogenen 15 ml Schraubdeckelröhrchen abzentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert und die Röhrchen wurden bei 60 °C für 24 h getrocknet. Anschließend wurde die Biotrockenmasse gravimetrisch bestimmt.

Die Bestimmung des Glyzeringehaltes in der *P. pastoris*-Kultur erfolgte mit Hilfe des Glycerin UV-Test von R-Biopharm. Die Mediumüberstände aus der Frischgewichtsbestimmung wurden 1:100 verdünnt eingesetzt und der Glyzeringehalt in g/L berechnet.

Die spezifische Wachstumsrate μ in h⁻¹ errechnet sich mit der Zelldichte C_x in kg m⁻³ und der Zeit t in Stunden nach folgender Formel:

$$\mu = \frac{\ln \left[\frac{C_x^{t_2}}{C_x^{t_1}} \right]}{t_2 - t_1}$$

4.7.4 Fermentation von *P. pastoris*

Vorbereitung und erste Phase der Fermentation

Für die Kultivierung von *P. pastoris* wurde ein 10 L Biostat Bioreaktor der Firma B. Braun verwendet. Das verwendete Medium YPG sowie 5 ml Ucolub Antischaummittel wurde nach Kalibrierung der pH-Elektrode eingefüllt und mit dem Fermenter sterilisiert. Anschließend wurde die Zugabeflasche für 10% NaOH steril angeschlossen und die Drehzahl auf

500 upm, die Temperatur auf 30 °C und die Belüftung auf 0,5 L/L min Sauerstoff eingestellt. Die Sauerstoffelektrode wurde auf 100% Sauerstoffsättigung kalibriert und der Reaktor mit 5% Inokulum beimpft. Sofort nach dem Animpfen sowie alle 4 h während der gesamten Fermentation wurde eine Probe (50 ml) genommen.

Der erste Teil der Fermentation bestand in allen Fällen aus der Biomassebildung durch Wachstum auf Glycerin. Der pH-Wert wurde durch automatische Laugen-Zugabe auf 6,0 eingestellt. Der Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration (dO_2) signalisiert den völligen Verbrauch des vorgelegten Glycerins und das Ende der ersten Fermentationsphase.

Induktion der Fremdgenexpression

Zur Induktion der Fremdgenexpression wurden die Zellen auf Methanolverwertung adaptiert. Eine Zugabeflasche mit 100% Methanol, 4 ml/L Spurenelemente PTM4 und 3 mM NaMolybdat wurde steril angeschlossen. Methanol wurde automatisch gesteuert in Intervallen zugeführt. Der Zulauf betrug 1 ml/L h während der ersten beiden Stunden, wurde dann alle 30 min um 10% erhöht, bis 3 ml/L h erreicht waren. Diese Zugabe wurde bis zum Ende der Fermentation beibehalten. Nach ≈70 Stunden auf Methanol erfolgte die Ernte der Kultur.

Eine andere Methode der Adaption an Methanolverwertung ist die gleichzeitige Zufuhr von Glycerin und Methanol während der Induktion („mixed feed“). Dazu wurde zusätzlich eine Zugabeflasche mit 50% Glycerin, 4 ml/L Spurenelemente PTM4 und 3 mM NaMolybdat steril angeschlossen. Während der ersten beiden Stunden betrug die Zufuhr 20 ml/L h. Die Glycerinfütterung wurde dann stündlich verringert von 10 ml/L h über 7,5 ml/L h bis auf 5 ml/L h, während gleichzeitig die Methanolzufuhr mit 1 ml/L h gestartet und wie oben beschrieben auf 3 ml/L h gesteigert wurde.

Die Ernte der Kultur erfolge in beiden Fällen durch Zentrifugation bei 2000 upm für 7 min bei 4 °C im Ausschwingrotor in einer Heraeus Cryofuge 5500i. Das Zellpellet wurde in Lysis-Puffer resuspendiert und bis zur Aufarbeitung bei –70 °C gelagert.

Spurenelementlösung PTM4:

2,00 g/L	CuSO ₄ x 5H ₂ O
0,08 g/L	KI
3,00 g/L	MnSO ₄ x H ₂ O
0,20 g/L	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O
0,02 g/L	H ₃ BO ₃
0,50 g/L	CaSO ₄ x 2H ₂ O
0,80 g/L	CoCl ₂ x 6H ₂ O
7,00 g/L	ZnCl ₂
22,0 g/L	FeSO ₄ x 7H ₂ O
0,20 g/L	Biotin
1,0 ml/L	conc. H ₂ SO ₄

Medium YPG:

10,0 g/L	Hefeextrakt
20,0 g/L	Pepton
10,0 ml/L	Glycerin
0,4 mg/L	Biotin

4.7.5 Proteinextraktion aus *P. pastoris*

Für den Zellaufschluss von *P. pastoris* kamen je nach Zellmenge unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Bei Volumina bis zu 5 ml wurden die aufgetauten und in Lysis-Puffer resuspendierten Zellen mit dem gleichen Volumen Säure-gewaschener Glasperlen (Sigma) versetzt und für insgesamt 30 min gevortext. Hierbei wurden die Zellen in Intervallen von je 30 s abwechselnd gevortext und auf Eis gelagert. Die Glasperlen wurden während 5 min bei 4000 g abzentrifugiert und der Überstand durch eine weitere Zentrifugation bei 35000 g für 30 min bei 4°C geklärt. Im Regelfall wurden die Zellen mittels drei Passagen durch eine French Press Zelle mit 1400 psi Druck aufgebrochen und anschließend wie oben beschrieben zentrifugiert. Große Zellvolumina von 0,5-1 L wurde mit Hilfe einer DYNO-Mill Rührwerkskugelmühle (Willy A. Bachofen AG) aufgearbeitet. Ein 0,6 L Mahlbehälter wurde nach Angaben des Herstellers zur Hälfte mit Glasperlen (0,75 mm Durchmesser) gefüllt und die resuspendierten Zellen wurden über eine externe Förderpumpe kontinuierlich zugeführt. Nach ca. drei Mahlgängen wurden die Zellreste abzentrifugiert.

In jedem Fall wurde das rekombinante Protein anschließend über den C-terminalen His-tag mittels Ni-NTA-Matrix aufgereinigt (siehe 4.3.1).

4.7.6 Expression der AAO1 in *P. pastoris*

Die rekombinante Überexpression der Aldehydoxidase AAO1 aus *A. thaliana* in *P. pastoris* erfolgte nach Koiwai *et al.* (2000) und Bittner *et al.* (2001).

4.8 Peroxisomenisolation

Die Peroxisomenisolation aus Blättern von *N. tabacum* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Yu u. Huang (1986). Vor Beginn der eigentlichen Präparation wurden die erforderlichen Percollgradienten in 40 ml Zentrifugenröhren (Nalgene) aufgeschichtet. Die einzelnen Lösungen setzten sich aus Percoll unterschiedlicher Konzentration und 1x Gradientenpuffer (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS pH 7,2; 0,2% BSA) zusammen. Zunächst wurden 10 ml der 45%igen Percollstufe mit 5 ml der 60%igen Percollstufe unterschichtet. Dann wurde mit jeweils 7 ml der 27%igen und der 21%igen Percollstufe überschichtet. Die beiden letzten Konzentrationen enthielten zusätzlich 0,75% Propandiol.

Alle weiteren Arbeiten erfolgten bei 4°C bzw. auf Eis. Als Ausgangsmaterial dienten 50 g vollentwickelte Blätter ohne Mittelrippe. Diese wurden in Bechergläsern mit halbgefrorenem Aufschlussmedium (350 mM Mannitol; 30 mM MOPS pH 7,2; 1 mM EDTA; 0,2% BSA; 0,6% PVP-40; 4 mM Cystein) bedeckt und wenige Sekunden mit einem Mixer zerkleinert. Das er-

haltene Homogenat wurde durch Miracloth (Calbiochem) direkt in 500 ml Zentrifugenbecher filtriert und für 1 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Zentrifugenröhrchen überführt und für 18 min bei 13700 g zentrifugiert, um Mitochondrien und Peroxisomen zu sedimentieren.

Das Sediment wurde mit einem weichen Pinsel in 50 ml Waschmedium A (300 mM Mannitol, 20 mM MOPS pH 7,2; 1 mM EDTA; 0,2% BSA) resuspendiert und für 5 min bei 26000 g zentrifugiert. Anschließend das Sediment erneut in ca. 1 ml Waschmedium A resuspendieren. Die so entstandene Suspension wurde auf die Percollgradienten verteilt und bei 13300 g für 12 min ohne Bremse zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden die beiden oberen Gradientenstufen abgenommen und verworfen. Die Peroxisomen befanden sich knapp ober- und unterhalb der Phasengrenze zwischen der 60- und 45% Stufe. Mit einer Gilson-Pipette wurden diese Fraktionen abgenommen, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und durch eine Zentrifugation für 20 min bei 8000 g ankonzentriert. Die gereinigten Peroxisomen wurden sofort weiterverwendet bzw. für kurze Zeit auf Eis gelagert.

5 Literaturverzeichnis

- Adams B**, Smith AT, Doyle WA, Bray RC, Ryan M, Harrison R, Wolstenhome AJ, Romão MJ, Huber R, Demais S, Scazzocchio C. (1997) Expression of wild type and mutated *Drosophila melanogaster* xanthine dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Biochem Soc Trans.* **25**, 520.
- Adams B**, Lowe DJ, Smith AT, Scazzocchio C, Demais S, Bray RC. (2002) Expression of *Drosophila melanogaster* xanthine dehydrogenase in *Aspergillus nidulans* and some properties of the recombinant enzyme. *Biochem J.* **362**, 223-229.
- Alamillo JM**, Garcia-Olmeedo F. (2001) Effects of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant J.* **25**, 529-540.
- Amaya Y**, Yamazaki K, Sato M, Noda K, Nishino T, Nishino T. (1990) Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J Biol Chem.* **265**, 14170-14175.
- Atkins CA**, Smith PMC. (2000) Ureide synthesis in legume nodules. In EJ Triplett, ed, Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process. Horizon Scientific Press, Wymondham Norfolk UK, 559-587.
- Ballou D**, Palmer G, Massey V. (1969) Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavin and of its catalytic decomposition by erythrocyte. *Biochem Biophys Res Commun.* **36**, 898-904.
- Barabás KN**, Omarov RT, Erdei L, Lips SH. (2000) Distribution of the Mo-enzymes aldehyde oxidase, xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in maize (*Zea mays* L.) nodal roots affected by nitrogen and salinity. *Plant Sci.* **155**, 49-58.
- Bastian NR**, Kay CJ, Barber MJ, Rajagopalan KV. (1991) Spectroscopic studies of the molybdenum-containing dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *J Biol Chem.* **266**, 45-51.
- Bechtold N**, Ellis J, Pelletier G. (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci. Paris, Life Sciences* **316**, 1194-1199.
- Berglund L**, Rasmussen JT, Andersen MD, Rasmussen MS, Petersen TE. (1996) Purification of the bovine xanthine oxidoreductase from milk fat globule membranes and cloning of complementary deoxyribonucleic acid. *J Dairy Sci.* **79**, 198-204.
- Bevan M**. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acid Research.* **12**, 8711-8721.
- Bittner F**, Oreb M, Mendel RR. (2001) ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* **276**, 40381-40384.
- Boland MJ**. (1981) NAD⁺:xanthine dehydrogenase from nodules of navy beans: partial purification and properties. *Biochem Int.* **2**, 567-574.
- Boyington JC**, Gladyshev VN, Khangulov SV, Stadtman TC, Sun PD. (1997) Crystal structure of formate dehydrogenase H: Catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine and an Fe₄S₄ cluster. *Science.* **275**, 1305-1308.
- Bradford MM**. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254.
- Bray RC**. (1975) Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In: Boyer PD, ed. *The Enzymes*. New York: Academic Press, 299-419.

- Bray RC.** (1988) The inorganic biochemistry of molybdoenzymes. *Q Rev Biophys.* **21**, 299-329.
- Brierley RA,** Bussineau C, Kosson R, Melton A, Siegel RS. (1990) Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. *Biochemical Engineering VI, Ann NY Acad Sci.* **589**, 350-363.
- Brunel A,** Echevin R. (1938) La présence, l'origine et le rôle physiologique des uréides glyoxyliques dans les germinations de *Soja hispida*. *Rev Gén Bot.* **50**, 73-93.
- Brunel A,** Capelle G. (1947) Sur l'importance biologique des uréides glyoxyliques chez les êtres vivants. I. L'allantoïne et l'acide allantoïque chez les végétaux. *Bull Soc Chim Biol.* **29**, 427-444.
- Buckholz RG,** Gleeson MAG. (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *BIO/TECHNOLOGY.* **9**, 1067-1072.
- Campbell WH.** (1999) Nitrate reductase structure, function, and regulation. Bridging the gap between biochemistry and physiology. In: Jones RL, Bohnert HJ, Walbot V, eds. *Annual Rev Plant Biol Plant Mol Biol.* **50**, 277-303.
- Cazzaniga G,** Terao M, Lo Schiavo P, Galbiati F, Segalla F, Seldin MF, Garattini E. (1994) Chromosomal mapping, isolation, and characterization of the mouse xanthine dehydrogenase gene. *Genomics.* **23**, 390-402.
- Cereghino JL,** Cregg JM. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* **24**, 45-66.
- Chern MS,** Bobb AJ, Bustos MM. (1996) The Regulator of MAT2 (ROM2) Protein binds to Early Maturation Promoters and Represses PvALF-Activated Transcription. *Plant Cell.* **8**, 305-321.
- Chilton WS,** Chilton MD. (1984) Mannityl opine analogs allow isolation of catabolic pathway regulatory mutants. *J Bacteriol.* **158**, 650-658.
- Cleere WF,** Coughlan MP. (1975) Avian xanthine dehydrogenases I. Isolation and characterization of the turkey liver enzyme. *Comp Biochem Physiol.* **50B**, 311-322.
- Corpas F J,** Gómez M, Hernández JA, del Río LA. (1993) Metabolism of activated oxygen in peroxisomes from two *Pisum sativum* L. cultivars with different sensitivity to sodium chloride. *J Plant Phys.* **141**, 160-165.
- Coughlan MP.** (1980) Aldehyde oxidase, xanthine dehydrogenase, hydroxylases containing molybdenum, iron-sulphur and flavin. In: *Molybdenum and Molybdenum-containing Enzymes*, Pergamon Press, Oxford, 121-185.
- Cove DJ,** Pateman JA. (1963) Independently segregating genetic loci concerned with nitrate reductase activity in *Aspergillus nidulans*. *Nature* **198**, 262-263.
- Covey SN,** Lomonossoff GP, Hull R. (1981) Characterization of cauliflower mosaic virus DNA sequences which encode major polyadenylated transcripts. *Nucleic Acid Res.* **9**, 6735-6747.
- Datta DB,** Triplett EW, Newcomb EH. (1991) Localization of xanthine dehydrogenase in cowpea root nodules: implications for the interaction between cellular compartments during ureide biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 4700-4702.
- Deblaere R,** Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acid Res.* **13**, 4777-4788.
- De Jong JW,** Van der Meer P, Nieukoop AS, Huizer T, Stroeve RJ, Bos E. (1990) Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans. *Circ Res.* **67**, 770-773.
- Della Corte E,** Stirpe F. (1968) The regulation of rat-liver xanthine oxidase: Activation by proteolytic enzymes. *FEBS Lett.* **2**, 83-84.
- Della Corte E,** Stirpe F. (1972) The regulation of rat-liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem J.* **126**, 739-745.

- Del Sal G**, Manfioletti G, Schneider C. (1989) The CTAB-DNA precipitation method: A common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Bio-Techniques*. **7**, 514-519.
- Dobbek H**, Gremer L, Meyer O, Huber R. (1999) Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selanyl cysteine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 8884-8889.
- Drake R**, John I, Farrell A, Cooper W, Schuch W, Grierson D. (1996) Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Mol Biol*. **30**, 755-767.
- Durner J**, Klessig DF. (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol*. **2**, 369-374.
- Eilers T**, Schwarz G, Brinkmann H, Witt C, Richter T, Nieder J, Koch B, Hille R, Hänsch R, Mendel RR. (2001) Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase. A new player in plant sulfur metabolism. *J Biol Chem*. **276**, 46989-46994.
- Enroth C**, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai EF. (2000) Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 10723-10728.
- Eulgem T**, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*. **5**, 199-206.
- Fosse R**. (1926) Un nouveau principe naturel des végétaux: l'acide allantoïque. *C R Acad Sc*. **182**, 869-871.
- Fosse R**, Brunel A, de Graeve P. (1929a) Analyse quantitative biochimique de l'allantoïne en présence de l'urée. *C R Acad Sc*. **188**, 1418-1421.
- Fosse R**, Brunel A, de Graeve P. (1929b) Transformation diastasique de l'acide urique en acide allantoïque. *C R Acad Sc*. **189**, 213-215.
- Fosse R**, de Graeve P, Thomas PE. (1932a) Un nouveau principe des végétaux: l'acide urique. *C R Acad Sc*. **194**, 1408-1413.
- Fosse R**, de Graeve P, Thomas PE. (1932b) Un nouveau principe des végétaux: l'acide urique. *C R Acad Sc*. **195**, 1198-1200.
- Fosse R**, de Graeve P, Thomas PE. (1933) Rôle de l'acide allantoïque chez les végétaux supérieurs. *C R Acad Sc*. **196**, 1264-1267.
- Gan S**, Amasino RM. (1997) Making sense of senescence. *Plant Physiol*. **133**, 313-319.
- García-Mata C**, Lamattina L. (2003) Absciscic acid, nitric oxide and stomatal closure – is nitrate reductase one of the missing links? *Trends Plant Sci*. **8**, 20-26.
- Gardner RC**, Howarth AJ, Hahn P, Brown-Luedi M, Shepherd RJ, Messing J. (1981) The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing. *Nucleic Acid Res*. **9**, 2871-2888.
- Gill GC**, Hippel PH. (1989) Calculation of protein extinction coefficient from amino acid sequence data. *Anal Biochem*. **182**, 319-326.
- Glatigny A**, Hof P, Romão MJ, Huber R, Scazzocchio C. (1998) Altered specificity mutations define residues essential for substrate positioning in xanthine dehydrogenase. *J Mol Biol*. **278**, 431-438.
- Glatigny A**, Scazzocchio C. (1995) Cloning and molecular characterization of *hxA*, the gene coding for the xanthine dehydrogenase (purine hydroxylase I) of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*. **270**, 3534-3550.
- Godber BL**, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eysen H, Harrison R. (2000) Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem*. **275**, 7757-7763.
- Guo FQ**, Okamoto M, Crawford NM. (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*. **302**, 100-103.
- Gupta UC**. (ed) (1997) Molybdenum in Agriculture. Cambridge University Press.
- Hanahan D**. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. **166**, 557.

- Harris CM**, Massey V. (1997) The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical. *J Biol Chem.* **272**, 8370-8379.
- Hesberg C**, Hänsch R, Mendel RR, Bittner F. (2004) Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* **279**, 13547-13554.
- Hille R**, Nishino T. (1995) Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J.* **9**, 995-1003.
- Hille R**. (1996) The mononuclear molybdenum Enzymes. *Chem Rev.* **96**, 2757-2816.
- Hinderhofer K**, Zentgraf U. (2001) Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta.* **213**, 469-473.
- Hoff T**, Schnorr KM, Meyer C, Caboche M. (1995) Isolation of two *Arabidopsis* cDNAs involved in early steps of molybdenum co-factor biosynthesis by functional complementation of *Escherichia coli* mutants. *J Biol Chem.* **270**, 6100-6107.
- Höfgen R**, Willmitzer L. (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9877.
- Hollenberg CP**, Gellissen G. (1997) Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr Opin Biotechnol.* **8**, 554-560.
- Horsch RB**, Rogers SG, Fraley RT. (1985) Transgenic plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **50**, 433-437.
- Houde M**, Tiveron MC, Bregegere F. (1989) Divergence of the nucleotide sequences encoding xanthine dehydrogenase in *Calliphora vicina* and *Drosophila melanogaster*. *Gene.* **85**, 391-402.
- Huber R**, Hof P, Duarte RO, Moura JJ, Moura I, Liu MY, LeGall J, Hille R, Archer M, Romão MJ. (1996) A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 8846-8851.
- Hunt J**, Massey V. (1992) Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase. *J Biol Chem.* **267**, 21479-21485.
- Hunt J**, Massey V, Dunham WR, Sands RH. (1993) Redox potentials of milk xanthine dehydrogenase. *J Biol Chem.* **268**, 18685-18691.
- Ikegami T**, Nishino T. (1986) The presence of desulfo xanthine dehydrogenase in purified and crude enzyme preparations from rat liver. *Arch Biochem Biophys.* **247**, 254-260.
- Jabs T**, Dietrich RA, Dangl JL. (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science.* **273**, 1853-1856.
- Jefferson RA**, Kavanagh TA, Bevan MW. (1987) GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907.
- Johnson JL**, Hainline BE, Rajagopalan KV. (1980) Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase and nitrate reductase. Identification of a pterin as structural component. *J Biol Chem.* **255**, 1783-1786.
- Johnson JL**, Hainline BE, Rajagopalan KV, Arison BH. (1984) The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *J Biol Chem.* **259**, 5414-5422.
- Johnson JL**, Bastian NR, Rajagopalan KV. (1990) Molybdopterin guanine dinucleotide: A modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* forma specialis denitrificans. *Proc Natl Acad Sci. USA* **87**, 1390-1394.
- Keith TP**, Riley MA, Kreitman M, Lewontin RC, Curtis D, Chambers G. (1987) Sequence of the structural gene for xanthine dehydrogenase (*rosy* locus) in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **116**, 67-73.
- Kilpatrick L**, Rajagopalan KV, Hilton J, Bastian NR, Stiefel EI, Pilato RS, Spiro TG. (1995) Resonance Raman spectroscopic characterization of the mo-

- lybdopterin active site of DMSO reductase. *Biochemistry*. **34**, 3032-3039.
- Koiwai H**, Akaba S, Seo M, Komano T, Koshiba T. (2000) Functional expression of two Arabidopsis aldehyde oxidases in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biochem*. **127**, 659-664.
- Koiwai H**, Nakaminami K, Seo M, Mitsuhashi W, Toyomasu T, Koshiba T. (2004) Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in Arabidopsis. *Plant Physiol*. **134**, 1697-1707.
- Kômoto N**, Yukuhiro K, Tamura T. (1999) Structure and expression of tandemly duplicated xanthine dehydrogenase genes of the silkworm (*Bombyx mori*). *Insect Mol Biol*. **8**, 73-83.
- Kramer SP**, Johnson JL, Ribeiro A, Millington DS, Rajagopalan KV. (1987) The structure of the molybdenum cofactor. Characterization of di(carboxamidomethyl)-molybdopterin from sulfite oxidase and xanthine oxidase. *J Biol Chem*. **262**, 16357-16363.
- Krenitsky TA**, Neil SM, Elion GB, Hitchings GH. (1972) A comparison of the specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxides. *Arch Biochem Biophys*. **150**, 585-599.
- Kuwabara Y**, Nishino T, Okamoto K, Matsumura T, Eger BT, Pai EF, Nishino T. (2003) Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 8170-8175.
- Laemmli KK**. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.
- Layzell DB**, Rainbird RM, Atkins CA, Pate JS. (1979) Economy of photosynthate use in nitrogen-fixing legume nodules. *Plant Phys*. **64**, 888-891.
- Lee CS**, Curtis D, McCarron M, Love C, Gray M, Bender W, Chovnick A. (1987) Mutations affecting expression of the rosy locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **116**, 55-66.
- Letourneur O**, Gervasi G, Gaia S, Pages J, Watelet B, Jolivet M. (2001) Characterization of *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) secreted from *Pichia pastoris*: evidence of hyper O-glycosylation. *Biotechnol Appl Biochem*. **33**, 35-45.
- Leimkühler S**, Kern M, Solomon PS, McEwan AG, Schwarz G, Mendel RR, Klipp W. (1998) Xanthine dehydrogenase from the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* is more similar to its eukaryotic counterparts than to prokaryotic molybdenum enzymes. *Mol Microbiol*. **27**, 853-869.
- Leimkühler S**, Hodson R, George GN, Rajagopalan KV. (2003) Recombinant *Rhodobacter capsulatus* xanthine dehydrogenase, a useful model system for the characterization of protein variants leading to xanthinuria I in humans. *J Biol Chem*. **278**, 20802-20811.
- Li H**, Samouilov A, Liu X, Zweier JL. Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *J Biol Chem*. **279**, 16939-16946.
- Lim PO**, Woo HR, Nam HG. (2003) Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*. **8**, 272-278.
- Logemann J**, Schell J, Willmitzer L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem*. **163**, 16-20.
- Lohmann KN**, Gan S, John MC, Amasino RM. (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*. **92**, 322-328.
- Massey V**, Edmondson D. (1970) On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J Biol Chem*. **245**, 6595-6598.
- Massey V**, Komai H, Palmer G, Elion G. (1970) On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo [3,4-d]-pyrimidines. *J Biol Chem*. **245**, 2837-2844.
- Massey V**, Harris CM. (1997) Milk xanthine dehydrogenase: the first one hundred years. *Biochem Soc Trans*. **25**, 750-755.
- McCord JM**, Fridovich I. (1968) The Reduction of Cytochrome c by Milk Xanthine Oxidase. *J Biol Chem*. **243**, 5753-5760.

- McCord JM.** (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* **312**, 159-163.
- McManaman JL,** Neville MC, Wright RM. (1999) Mouse mammary gland xanthine oxidoreductase: purification, characterization, and regulation. *Arch Biochem Biophys.* **371**, 308-316.
- Mehra RK,** Coughlan MP. (1984) Purification and properties of purine hydroxylase II from *Aspergillus nidulans*. *Arch Biochem Biophys.* **229**, 585-595.
- Mendel RR,** Müller A. (1976) A common genetic determination of xanthine dehydrogenase and NR in *N. tabacum*. *Biochem Physiol Pflanz.* **170**, 538-541.
- Mendel RR.** (1992) The plant molybdenum cofactor (MoCo) - its biochemical and molecular genetics. *Plant Mol. Biol.* **1**, 11-16.
- Mendel RR,** Schwarz G. (2002) Biosynthesis and molecular biology of the molybdenum cofactor (Moco). In "Molybdenum and tungsten: Their roles in biological processes", Metal ions in biological systems. Sigel, A. and Sigel, H. (eds); Dekker, M.; Inc., New York, Vol. **39**.
- Menkens AE,** Schindler U, Cashmore AR. (1995) The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci.* **20**, 506-510.
- Miles DJ,** Busser B, Stalder C, Higgins DR. (1998) Isolation of nucleic acids. In: *Pichia protocols. Meth Mol Biol.* **103**, Humana Press, Totowa, New Jersey, 73-80.
- Moffat BA,** Ashihara H. (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. In: The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists.
- Montalbini P.** (1992a) Inhibition of hypersensitive response by allopurinol applied to the host in the incompatible relationship between *Phaseolus vulgaris* and *Uromyces phaseoli*. *J Phytopath.* **134**, 218-228.
- Montalbini P.** (1992b) Ureides and enzymes of ureide synthesis in wheat seeds and leaves and effect of allopurinol on *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* infection. *Plant Sci* **87**, 225-231.
- Montalbini P.** (1995) Effect of rust infection on purine catabolism enzyme levels in wheat leaves. *Phys Mol Plant Path.* **46**, 275-292.
- Montalbini P,** Della Torre G. (1996) Evidence of a two-fold mechanism responsible for the inhibition by allopurinol of the hypersensitive response induced in tobacco by tobacco necrosis virus. *Phys Mol Plant Path.* **48**, 273-287.
- Montalbini P.** (1998) Purification and some properties of xanthine dehydrogenase from wheat leaves. *Plant Sci.* **134**, 89-102.
- Montalbini P.** (2000) Xanthine dehydrogenase from leaves of leguminous plants: purification, characterization and properties of the enzyme. *J Plant Phys.* **156**, 3-16.
- Morel JB,** Dangl JL. (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ.* **4**, 671-683.
- Murashige T,** Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* **15**, 473-497.
- Nason A,** Lee KY, Pan SS, Ketchum, PA, Lamberti A, De Vries J. (1971) *In vitro* formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: Nitrate reductase from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* **68**, 3232-3246.
- Nguyen J.** (1973) Mise en évidence d'une activité xanthine oxydasique de type déshydrogénase chez le *Pharbitis nil* Chois. *C R Acad Sc.* **276**, 3025-3027.
- Nguyen J,** Feierabend J. (1978) Some properties and subcellular localization of xanthine dehydrogenase in pea leaves. *Plant Sci Lett.* **13**, 125-132.
- Nishino T,** Nishino T. (1989) The nicotinamide adenine dinucleotide-binding site of chicken liver xanthine dehydrogenase. Evidence for alteration of the redox potential of the flavin by NAD binding or modification of the NAD-binding site and isolation of a modified peptide. *J Biol Chem.* **264**, 5468-5473.

- Nishino T**, Nishino T, Schopfer LM, Massey V. (1989) The reactivity of chicken liver xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. *J Biol Chem.* **264**, 2518-2527.
- Nishino T**. (1994) The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J Biochem.* **116**, 1-6.
- Nishino T**, Kashima Y, Okamoto K, Iwasaki T, Nishino T. (1997) The monomeric form of xanthine dehydrogenase expresses in baculovirus-insect cell system. In: Stevenson KJ, Massey V, Williams CH eds. *Flavins and flavoproteins*. Calgary: University of Calgary Press, 843-846.
- Nishino T**, Nishino T. (1997) The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J Biol Chem.* **272**, 29859-29864.
- Nishino T**, Amaya Y, Kawamoto S, Kashima Y, Okamoto K, Nishino T. (2002) Purification and characterization of multiple forms of rat liver xanthine oxidoreductase expressed in baculovirus-insect cell system. *J Biochem (Tokyo)*. **132**, 597-606.
- Nowak K**. (2004) Fluoreszierende Proteine als Vitalmarker in pflanzlichen Systemen am Beispiel der subzellulären Lokalisierung von Proteinen der Molybdän-Cofaktor-Biosynthese, dem pflanzlichen Molybdo-Enzym Sulfitoxidase und von Sulfotransferasen. *Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig*.
- Omarov RT**, Akaba S, Koshiba T, Lips HS. (1999) Aldehyde oxidase in roots, leaves, and seeds of barley (*Hordeum vulgar* L.). *J Exp Bot.* **50**, 63-69.
- Overmyer K**, Brosché M, Kangasjärvi J. (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.* **8**, 335-342.
- Palmer T**, Santini CL, Iobbi-Nivol C, Eaves DJ, Boxer DH, Giordano G. (1996) Involvement of the narJ and mob gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**, 875-884.
- Parks DA**, Granger DN. (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand.* **548**, 87-99.
- Pastori GM**, Del Río LA. (1997) Natural Senescence of Pea Leaves (An Activated Oxygen-Mediated Function for Peroxisomes). *Plant Physiol.* **113**, 411-418.
- Pateman JA**, Cove DJ, Rever BM, Roberts DB. (1964) A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature.* **201**, 58-60.
- Patton S**, Keenan TW. (1975) The milk fat globule membrane. *Biochim Biophys Acta.* **415**, 273-309.
- Pérez-Vicente R**, Pineda M, Cárdenas J. (1988) Isolation and characterization of xanthine dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol. Plant.* **72**, 101-107.
- Pérez-Vicente R**, Alamillo JM, Cardenas J, Pineda M. (1992) Purification and substrate inactivation of xanthine dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta.* **1117**, 159-166.
- Pitterle DM**, Rajagopalan KV. (1993) Biosynthesis of molybpterin in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the converting factor. *J Biol Chem.* **268**, 13499-13505.
- Pitterle DM**, Johnson JL, Rajagopalan KV. (1993) *In vitro* synthesis of molybpterin from precursor Z using purified converting factor. *J Biol Chem.* **262**, 13506-13509.
- Rajagopalan KV**, Handler P. (1964) Hepatic aldehyde oxidase II. & III. *J Biol Chem.* **237**, 2026-2035.
- Rajagopalan KV**, Handler P. (1967) Purification and properties of chicken liver xanthine dehydrogenase. *J Biol Chem.* **242**, 4097-4107.
- Rajagopalan KV**. (1996) Biosynthesis of the molybdenum cofactor. In: Neidhardt, F. C. (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. ASM Press. Washington DC, 674-679.
- Rasmussen JT**, Rasmussen MS, Petersen TE. (2000) Cysteines involved in the interconversion between dehydrogenase and oxidase forms of bo-

- vine xanthine oxidoreductase. *J Dairy Sci.* **83**, 499-506.
- Reichel C**, Mathur J, Eckes P, Langenkemper K, Koncz C, Schell J, Reiss B, Maas C. (1996) Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 5888-5893.
- Reichert DA**, Westerfeld WW. (1953) Isolation and identification of the xanthine oxidase factor as molybdenum. *J Biol Chem.* **203**, 915-923.
- Reinbothe H**, Mothes K. (1962) Urea, ureides, and guanidines in plants. *Ann Rev Plant Physiol.* **13**, 129-151.
- Robins RK**, Revankar GR, O'Brien DE, Springer RH, Novinson R, Albert A, Senga K, Miller JP, Streeter DG. (1985) Purine analog inhibitors of xanthine oxidase. Structure activity relationships and proposed binding of the molybdenum cofactor. *J Heterocycl Chem.* **22**, 601-634.
- Rocher-Chambonnet C**, Berreur P, Houde M, Tiveron MC, Lepesant JA, Bregegere F. (1987) Cloning and partial characterization of the xanthine dehydrogenase gene of *Calliphora vicina*, a distant relative of *Drosophila melanogaster*. *Gene.* **59**, 201-212.
- Rockel P**, Stube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM. (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Bot.* **53**, 103-110.
- Rodríguez-Trelles F**, Tarrío R, Ayala FJ. (2003) Convergent neofunctionalization by positive Darwinian selection after ancient recurrent duplications of the *xanthine dehydrogenase* gene. *Proc Natl Acad Sci. (USA)* **100**, 13413-13417.
- Romão MJ**, Archer M, Moura I, Moura JJ, Le Gall J, Engh R, Schneider M, Hof P, Huber R. (1995) Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from *D. gigas*. *Science.* **270**, 1170-1176.
- Ryu SB**, Wang X. (1995) Expression of Phospholipase D during castor bean leaf senescence. *Plant Physiol.* **108**, 713-719.
- Saghai-Mahoof MA**, Soliman KM, Jorgensen R, Allard RA. (1984) Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci. (USA)* **81**, 8014-8018.
- Saksela M**, Raivio KO. (1996) Cloning and expression *in vitro* of human xanthine dehydrogenase/oxidase. *Biochem J.* **315**, 235-239.
- Saksela M**, Lapatto R, Raivio KO. (1998) Xanthine oxidoreductase gene expression and enzyme activity in developing human tissues. *Biol Neonate.* **74**, 274-280.
- Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanford JC**. (1988) The biolistic process. *Tibtech.* **6**, 299-302.
- Sandalio LM**, Fernández VM, Rupérez FL, del Río LA. (1988) Superoxide free radicals are produced in in glyoxysomes. *Plant Phys.* **127**, 1-4.
- Sato A**, Nishino T, Noda K, Amaya Y, Nishino T. (1995) The structure of chicken liver xanthine dehydrogenase. cDNA cloning and the domain structure. *J Biol Chem.* **270**, 2818-2826.
- Sauer P**, Frébortová J, Šebela M, Galuszka P, Jacobsen S, Peč P, Frébort I. (2002) Xanthine dehydrogenase of pea seedlings: a member of the plant molybdenum oxidoreductase family. *Plant Physiol Biochem.* **40**, 393-400.
- Schindelin H**, Kisker C, Hilton J, Rajagopalan KV, Rees DC. (1996) The overall fold of *Rhodobacter sphaeroides* DMSO reductase is similar to that of FDH. *Science* **272**, 1615-1619.
- Schraudner M**, Moeder W, Wiese C, van Camp W, Inzé D, Langebartels C, Sandermann HJ. (1998) Ozone-induced oxidative burst in the ozone bio-monitor plant, tobacco Bel W3. *Plant J.* **16**, 235-245.

- Schubert K.** (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, transport and metabolism. *Ann Rev Plant Physiol.* **37**, 539-754.
- Schulze E,** Barbieri J. (1881) Über das Vorkommen von Allantoin im Pflanzenorganismus. *Ber Dtsch Chem Ges.* **14**, 1602-1605.
- Schwartz SH,** Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M, Zeevaart JA. (1997) Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**, 161-166.
- Sekimoto H,** Seo M, Dohmae N, Takio K, Kamiya Y, Koshiba T. (1997) Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase. *J Biol Chem.* **272**, 15280-15285.
- Sekimoto H,** Seo M, Kawakami N, Komano T, Desloire S, Liotenberg S, Marion-Poll A, Caboche M, Kamiya Y, Koshiba T. (1998) Molecular cloning and characterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **39**, 433-442.
- Seo M,** Akaba S, Oritani T, Delarue M, Bellini C, Caboche M, Koshiba T. (1998) Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing *super-root1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Phys.* **116**, 687-693.
- Seo M,** Koiwai H, Akaba S, Komano T, Oritani T, Kamiya Y, Koshiba T. (2000) Absciscic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal.* **23**, 482-488.
- Shah VK,** Brill WJ. (1977) Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci. USA* **74**, 3249-3253.
- Simmonds HA,** Reiter S, Nishino T. (1995) Hereditary xanthinuria. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* **2**, New York: McGraw-Hill, 1781-1798.
- Sreekrishna K,** Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A, Birkenberger LA. (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene.* **190**, 55-62.
- Stallmeyer B,** Nerlich A, Schiemann J, Brinkmann H, Mendel RR. (1995) Molybdenum co-factor biosynthesis: the *Arabidopsis thaliana* cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three *Escherichia coli* proteins. *The Plant Journal* **8**, 751-762.
- Stratton J,** Chiruvolu V, Meagher M. (1998) High cell-density fermentation. In: *Pichia protocols. Meth Mol Biol* **103**, Humana Press, Totowa, New Jersey, 107-120.
- Stirpe F,** Della Corte E (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem.* **244**, 3855-3863.
- Taylor CB,** Bariola PA, del Cardayre SB, Raines RT, Green PJ. (1993) RNS2: a senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**, 5118-5122.
- Taylor NJ,** Cowan AK. (2004) Xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase impact plant hormone homeostasis and affect fruit size in "Hass" avocado. *J Plant Res.* **117**, 121-130.
- Temple CA,** Graf TN, Rajagopalan KV. (2000) Optimization of expression of human sulfite oxidase and its molybdenum domain. *Arch Biochem Biophys.* **383**, 281-287.
- Terao M,** Cazzaniga G, Ghezzi P, Bianchi M, Falciani F, Perani P, Garattini E. (1992) Molecular cloning of a cDNA coding for mouse liver xanthine dehydrogenase. Regulation of its transcript by interferons in vivo. *Biochem J.* **283**, 863-870.
- The Arabidopsis Genome Initiative.** (2000) Analysis of the genomic sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* **408**, 796-815.
- Thefeld W,** Dortsch R. (1995) Serumharnsäurewerte, Hyperurikämie und Gicht. In: Die Gesundheit der Deutschen. Hrsg. H. Hoffmeister, B.-M. Bellach. *RKI-Heft* **7**, 140-143.
- Töpfer R,** Matzeit V, Gronenborn B, Schell J, Steinbiss HH. (1987) A set of plant expression vectors for

- transcriptional fusions. *Nucl. Acid Res.* **15**, 5890-5895.
- Viscontini M.** (1971) Pterins and folate analogs. *Meth Enzym.* **XVIII**, 253-285.
- Wahl RC**, Rajagopalan KV. (1982) Evidence for the inorganic nature of the cyanolyzable sulfur of molybdenum hydroxylases. *J Biol Chem.* **257**, 1354-1359.
- Wahl RC**, Warner CK, Finnerty V, Rajagopalan KV. (1982) *Drosophila melanogaster* *ma-I* mutants are defective in the sulfuration of desulfo Mo hydroxylases. *J Biol Chem.* **257**, 3958-3962.
- Walbot V.** (2000) A green chapter in the book of life. *Natures.* **408**, 794-795.
- Waud WR**, Rajagopalan KV. (1976) Purification of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂-dependent forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* **172**, 354-364.
- Wilson R**, Ainscough R, Anderson K, Baynes C, Berks M, Bonfield J, Burton J, Connell M, Copsey T, Cooper J. (1994) 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature.* **368**, 32-38.
- Wohlgemuth H**, Mittelstrass K, Kschieschan S, Bender J, Weigel HJ, Overmyer K, Kangasjärvi J, Langebartels C, Sandermann H. (2002) Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell Environ.* **25**, 717-726.
- Wright RM**, Vaitaitis GM, Wilson CM, Repine TB, Terada LS, Repine JE. (1993) cDNA cloning, characterization, and tissue-specific expression of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 10690-10694.
- Xi H**, Schneider BL, Reitzer L. (2000) Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage. *J Bacteriology* **182**, 5332-5341.
- Xiong L**, Ishitani M, Lee H, Zhu JK. (2001) The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell.* **13**, 2063-2083.
- Xu P**, Hueckstaedt TP, Hoidal TP. (1996) Molecular cloning and characterization of the human xanthine dehydrogenase gene. *Genomics.* **34**, 173-180.
- Yu C**, Huang AHC. (1986) Conversion of serine to glycinate in intact spinach leaf peroxisomes: Role of malate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* **245**, 125-133.
- Yunes JA**, Neto GC, da Silva MJ, Leite A, Ottoboni LMM, Arruda P. (1994) The transcriptional Activator Opaque2 recognizes two different target sequences in the 22-kD-like α -Prolamin Genes. *Plant Cell.* **6**, 237-259.

6 Anhang

6.1 Primer

Tab. 6-1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Primer- Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Verwendung
Klonierung <i>AtXDH2</i> cDNA		
XDH2_5'XhoI	CAG TTA CTC GAG TGG GTT CAG TGA	5' <i>XhoI</i> -Schnittstelle
XDH2_3'XhoI	GAC AAA CTC GAG TGA TCC ATC TTT CTC CCC	3' <i>XhoI</i> -Schnittstelle
XDH2_2047+	TTA TTT GCT CGA GAC GTG GTC ACG TGT	<i>XhoI</i> -Schnittstelle an Pos. 2020
Klonierung <i>AtXDH1</i> in pTrcHis		
XDH1 NheI Start	ATA TAT GCT AGC ATG GGT TCA ACT GAA AAA GGA CGG C	5' <i>NheI</i> -Schnittstelle
XDH1 BamHI Stop	ATA TAT GGA TCC TCA AAC ACT AAG ATT AGG GTA GAA ATC TGA	3' <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
Klonierung <i>AtXDH1</i> in pPICZA		
XDH1 KpnI Start	ATA TAT GGT ACC ATG GGT TCA ACT GAA AAA GGA CGG C	5' <i>KpnI</i> -Schnittstelle
XDH1 ApaI-Stop	ATA TAT GGG CCC AAC ACT AAG ATT AGG GTA GAA ATC TGA	3' <i>ApaI</i> -Schnittstelle
Klonierung <i>AtXDH1</i> in pBSGFP		
XDH1 BamHI Start	ATA TAT GGA TCC ATG GGT TCA ACT GAA AAA GGA CGG C	5' <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
XDH1 BamHI Stop	ATA TAT GGA TCC TCA AAC ACT AAG ATT AGG GTA GAA ATC TGA	3' <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
XDH1 BamHI-Stop	ATA TAT GGA TCC AAC ACT AAG ATT AGG GTA GAA ATC TGA	3' <i>Bam</i> HI-Schnittstelle vor Stop
Promotor-GUS-Konstrukte		
XDH1 Prom ATGre	TAT ATA CCA TGG TCA AAT TGA GAG AAA ACT CGA TTG G	Klonierung eines 2 kb Fragmentes aufwärts vom ATG der <i>AtXDH1</i>
XDH1 Prom 2000	ATA TAT GAA TTC CAA AGG TTG CTC AAG TTG CTG CAA CGG	
XDH2 Prom EcoRI	ATA TCG GAA TTC TCG TAT AGG TGC CCA CAA G	Klonierung eines 2 kb Fragmentes aufwärts vom ATG der <i>AtXDH2</i>
XDH2 Prom NcoI	CTG CTC CAT GGT CAC TGA ACC CAG ACG AAT	
semiquantitative RT-PCR		
RT_XDH1 for	CAC ATT TAC TGA GCT AGT A	693 bp-Fragment <i>XDH1</i> -cDNA
RT_XDH1 rev	GTT TCC CCT CTG ATG ATG TTC	
RT_XDH2 for	TCT TCT CAA GGG TAA TCC A	279 bp-Fragment <i>XDH2</i> -cDNA
RT_XDH2 rev	TTC TCC CCT CTA TTA AAG TTT	
Inverse PCR		
LB_TDNA_pAC	ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT GC	flankierende Bereiche der linken Grenze <i>AtXDH1</i> -ko
LB_rev1	GGG TTC TTA TAG GGT TTC GCT C	
pROK2_HIII LB	CTC TAA CCA TCT GTG GGT TAG C	flankierende Bereiche der linken Grenze <i>AtXDH2</i> -ko
pROK2_Bgl LB	GTG TTT GAC AGG ATA TAT TGG CGG	

6.2 Sequenzen

6.2.1 Sequenz der *AtXDH1*-cDNA (GenBank Accession: AY171562)

Länge der *AtXDH1*-cDNA: 4087 bp; translatiert von 1 bis 4087.

```

M   G   S   L   K   K   D   G   E   I   G   D   E   F   T   E   A   L
ATG GGT TCA CTG AAA AAG GAC GGC GAG ATC GGA GAT GAG TTT ACG GAG GCG TTA
          9          18          27          36          45          54

L   Y   V   N   G   V   R   R   V   L   P   D   G   L   A   H   M   T   L   L
CTG TAC GTT AAC GGC GTT CGT AGA GTC TTG CCT GAT GGA TTG GCT CAT ATG ACA CTT CTC
          63          72          81          90          99          108

E   Y   L   R   D   L   G   L   T   G   T   K   L   G   C   G   E   G   G   C
GAA TAT CTC AGA GAT TTA GGA TTG ACC GGT ACA AAG CTG GGA TGC GGC GAA GGT GGT TGT
          123          132          141          150          159          168

G   A   C   T   V   M   V   S   S   Y   D   R   K   S   K   T   S   V   H   Y
GGG GCT TGC ACG GTG ATG GTG TCT AGT TAT GAC AGG AAG TCA AAG ACC TCT GTG CAT TAT
          183          192          201          210          219          228

A   V   N   A   C   L   A   P   L   Y   S   V   E   G   M   H   V   I   S   I
GCT GTC AAC GCT TGC CTA GCA CCT CTC TAT TCT GTA GAA GGG ATG CAT GTA ATA TCC ATT
          243          252          261          270          279          288

E   G   L   G   H   R   K   L   G   L   H   P   V   Q   E   S   L   A   S   S
GAG GGA CTT GGG CAT CGC AAA CTT GGC TTG CAC CCT GTC CAG GAG TCT TTG GCA TCT TCC
          303          312          321          330          339          348

H   G   S   Q   C   G   F   C   T   P   G   F   I   M   S   M   Y   S   L   L
CAT GGT TCC CAA TGT GGG TTT TGT ACT CCC GGG TTT ATC ATG TCC ATG TAT TCG TTG TTG
          363          372          381          390          399          408

R   S   S   K   N   S   P   S   E   E   E   I   E   E   C   L   A   G   N   L
AGG TCA AGT AAA AAC TCA CCT TCT GAG GAG GAG ATT GAA GAA TGT CTT GCA GGA AAT CTA
          423          432          441          450          459          468

C   R   C   T   G   Y   R   P   I   V   D   A   F   R   V   F   A   K   S   D
TGT CGT TGT ACT GGT TAT CGA CCC ATT GTT GAT GCG TTT CGG GTT TTT GCA AAA TCT GAT
          483          492          501          510          519          528

D   A   L   Y   C   G   V   S   S   L   S   L   Q   D   G   S   T   I   C   P
GAT GCT CTC TAC TGT GGT GTA TCT TCA CTT AGC CTT CAA GAT GGT TCT ACT ATT TGC CCA
          543          552          561          570          579          588

S   T   G   K   P   C   S   C   G   S   K   T   T   N   E   V   A   S   C   N
TCT ACT GGC AAA CCT TGC TCT TGT GGA TCA AAA ACA ACA AAT GAA GTT GCC AGT TGT AAT
          603          612          621          630          639          648

E   D   R   F   Q   S   I   S   Y   S   D   I   D   G   A   K   Y   T   D   K
GAA GAT AGA TTT CAG TCA ATC TCT TAT AGT GAT ATA GAT GGA GCT AAG TAT ACA GAT AAG
          663          672          681          690          699          708

E   L   I   F   P   P   E   L   L   L   R   K   L   T   P   L   K   L   R   G
GAG CTT ATT TTC CCC CCT GAA CTT TTG CTG AGG AAG TTA ACT CCC TTA AAG TTA AGG GGA
          723          732          741          750          759          768

N   G   G   I   T   W   Y   R   P   V   C   L   Q   N   L   L   E   L   K   A
AAT GGG GGG ATT ACC TGG TAT AGA CCC GTA TGT CTT CAG AAC TTG CTT GAG CTC AAA GCA
          783          792          801          810          819          828

N   Y   P   D   A   K   L   L   V   G   N   T   E   V   G   I   E   M   R   L
AAT TAT CCT GAT GCA AAA CTA CTG GTA GGT AAT ACA GAG GTG GGA ATC GAA ATG AGA TTG
          843          852          861          870          879          888

K   R   L   Q   Y   Q   V   L   I   S   V   A   Q   V   P   E   L   N   A   L
AAG AGG TTA CAG TAT CAG GTG CTG ATC TCT GTT GCT CAA GTC CCA GAA CTC AAC GCA TTG
          903          912          921          930          939          948

N   V   N   D   N   G   I   E   V   G   S   A   L   R   L   S   E   L   L   R
AAT GTC AAT GAC AAT GGG ATA GAG GTT GGT TCA GCT TTG AGA CTT TCT GAA CTC CTG AGG
          963          972          981          990          999          1008

```

6. ANHANG

L	F	R	K	I	V	K	E	R	P	A	H	E	T	S	A	C	K	A	F
TTA	TTC	AGG	AAG	ATA	GTA	AAG	GAG	CGT	CCT	GCA	CAT	GAA	ACA	TCA	GCA	TGC	AAG	GCT	TTT
	1023			1032			1041			1050			1059			1068			
I	E	Q	L	K	W	F	A	G	T	Q	I	R	N	V	A	C	I	G	G
ATC	GAA	CAG	CTG	AAG	TGG	TTT	GCT	GGG	ACA	CAA	ATA	AGA	AAT	GTT	GCT	TGC	ATT	GGT	GGA
	1083			1092			1101			1110			1119			1128			
N	I	C	T	A	S	P	I	S	D	L	N	P	L	W	M	A	S	R	A
AAC	ATC	TGT	ACA	GCT	AGT	CCA	ATA	TCT	GAT	TTA	AAT	CCT	CTT	TGG	ATG	GCT	TCA	AGA	GCA
	1143			1152			1161			1170			1179			1188			
E	F	R	I	T	N	C	N	G	D	V	R	S	I	P	A	K	D	F	F
GAG	TTT	CGG	ATA	ACC	AAC	TGC	AAT	GGA	GAT	GTT	AGG	TCT	ATA	CCT	GCA	AAA	GAT	TTC	TTC
	1203			1212			1221			1230			1239			1248			
L	G	Y	R	K	V	D	M	G	S	N	E	I	L	L	S	V	F	L	P
CTC	GGT	TAT	CGT	AAA	GTG	GAT	ATG	GGG	AGC	AAC	GAG	ATC	TTG	TTG	TCG	GTA	TTC	CTT	CCA
	1263			1272			1281			1290			1299			1308			
W	T	R	P	L	E	Y	V	K	E	F	K	Q	A	H	R	R	D	D	D
TGG	ACA	AGA	CCC	TTA	GAG	TAT	GTG	AAA	GAA	TTT	AAG	CAG	GCC	CAT	CGC	AGG	GAT	GAT	GAT
	1323			1332			1341			1350			1359			1368			
I	A	I	V	N	G	G	M	R	V	F	L	E	D	K	G	Q	Q	L	F
ATA	GCT	ATT	GTC	AAT	GGT	GGA	ATG	CGT	GTG	TTT	CTT	GAA	GAC	AAG	GGT	CAA	CAA	TTG	TTC
	1383			1392			1401			1410			1419			1428			
V	S	D	A	S	I	A	Y	G	G	V	A	P	L	S	L	C	A	R	K
GTT	TCT	GAT	GCA	TCC	ATT	GCT	TAT	GGA	GGT	GTG	GCT	CCT	CTT	TCT	TTG	TGT	GCG	AGA	AAG
	1443			1452			1461			1470			1479			1488			
T	E	E	F	L	I	G	K	N	W	N	K	D	L	L	Q	D	A	L	K
ACT	GAA	GAG	TTT	CTA	ATT	GGA	AAG	AAT	TGG	AAT	AAA	GAT	CTT	CTG	CAG	GAT	GCG	CTT	AAG
	1503			1512			1521			1530			1539			1548			
V	I	Q	S	D	V	V	I	K	E	D	A	P	G	G	M	V	E	F	R
GTC	ATA	CAG	AGC	GAT	GTC	GTG	ATT	AAG	GAA	GAT	GCT	CCT	GGG	GGA	ATG	GTG	GAG	TTT	CGG
	1563			1572			1581			1590			1599			1608			
K	S	L	T	L	S	F	F	F	K	F	F	L	W	V	S	H	N	V	N
AAA	TCT	CTA	ACC	CTA	AGC	TTC	TTC	TTT	AAA	TTT	TTC	TTA	TGG	GTT	TCT	CAT	AAT	GTC	AAT
	1623			1632			1641			1650			1659			1668			
N	A	N	S	A	I	E	T	F	P	P	S	H	M	S	A	V	Q	P	V
AAT	GCA	AAT	TCT	GCG	ATA	GAG	ACC	TTC	CCA	CCC	TCC	CAT	ATG	TCA	GCT	GTG	CAA	CCT	GTT
	1683			1692			1701			1710			1719			1728			
P	R	L	S	R	I	G	K	Q	D	Y	E	T	V	K	Q	G	T	S	V
CCT	CGG	TTA	TCT	AGA	ATT	GGA	AAA	CAA	GAC	TAT	GAG	ACA	GTA	AAG	CAG	GGA	ACA	TCT	GTT
	1743			1752			1761			1770			1779			1788			
G	S	S	E	V	H	L	S	A	R	M	Q	V	T	G	E	A	E	Y	T
GGC	TCG	TCG	GAG	GTG	CAT	CTT	TCA	GCG	AGA	ATG	CAG	GTC	ACA	GGG	GAA	GCG	GAA	TAT	ACT
	1803			1812			1821			1830			1839			1848			
D	D	T	P	V	P	P	N	T	L	H	A	A	F	V	L	S	K	V	P
GAT	GAT	ACT	CCA	GTA	CCT	CCT	AAT	ACC	TTA	CAT	GCT	GCC	TTT	GTG	CTA	AGC	AAA	GTG	CCA
	1863			1872			1881			1890			1899			1908			
H	A	R	I	L	S	I	D	D	S	A	A	K	S	S	S	G	F	V	G
CAT	GCC	CGC	ATC	CTT	TCA	ATC	GAT	GAT	TCG	GCA	GCC	AAA	TCT	TCA	TCT	GGT	TTT	GTT	GGT
	1923			1932			1941			1950			1959			1968			
L	F	L	A	K	D	I	P	G	D	N	M	I	G	P	I	V	P	D	E
CTG	TTT	CTT	GCC	AAA	GAT	ATT	CCT	GGG	GAT	AAT	ATG	ATT	GGA	CCA	ATT	GTT	CCC	GAC	GAA
	1983			1992			2001			2010			2019			2028			
E	L	F	A	T	D	V	V	T	C	V	G	Q	V	I	G	V	V	V	A
GAA	TTA	TTT	GCT	ACA	GAT	GTG	GTC	ACG	TGT	GTG	GGA	CAA	GTC	ATT	GGT	GTG	GTC	GTC	GCG
	2043			2052			2061			2070			2079			2088			
D	T	H	E	N	A	K	T	A	A	G	K	V	D	V	R	Y	E	E	L
GAT	ACA	CAT	GAA	AAT	GCA	AAA	ACT	GCA	GCA	GGA	AAA	GTT	GAC	GTT	AGG	TAT	GAG	GAA	CTA
	2103			2112			2121			2130			2139			2148			

6. ANHANG

P	A	I	L	S	I	K	E	A	I	N	A	K	S	F	H	P	N	T	E
CCA	GCA	ATA	TTA	TCA	ATC	AAG	GAG	GCT	ATT	AAT	GCT	AAA	AGT	TTC	CAT	CCG	AAC	ACA	GAG
	2163				2172			2181			2190			2199			2208		
K	R	L	R	K	G	D	V	E	L	C	F	Q	S	G	Q	C	D	R	V
AAA	AGG	CTA	AGA	AAA	GGG	GAT	GTC	GAG	CTG	TGT	TTT	CAA	TCT	GGT	CAG	TGT	GAC	AGG	GTA
	2223				2232			2241			2250			2259			2268		
I	E	G	E	V	Q	M	G	G	Q	E	H	F	Y	L	E	P	N	G	S
ATA	GAG	GGA	GAG	GTT	CAA	ATG	GGT	GGT	CAG	GAA	CAC	TTC	TAC	TTG	GAG	CCT	AAT	GGT	AGT
	2283				2292			2301			2310			2319			2328		
L	V	W	T	V	D	G	G	S	E	V	H	M	I	S	S	T	Q	A	P
TTG	GTT	TGG	ACA	GTA	GAT	GGG	GGC	AGC	GAA	GTT	CAT	ATG	ATT	TCA	TCC	ACA	CAG	GCT	CCT
	2343				2352			2361			2370			2379			2388		
Q	K	H	Q	K	Y	V	S	H	V	L	G	L	P	M	S	K	V	V	C
CAA	AAG	CAC	CAG	AAA	TAT	GTG	TCG	CAT	GTT	CTT	GGT	CTT	CCG	ATG	TCT	AAA	VTG	GTA	TGC
	2403				2412			2421			2430			2439			2448		
K	T	K	R	I	G	G	G	F	G	G	K	E	T	R	S	A	F	I	A
AAA	ACC	AAA	CGA	ATT	GGT	GGT	GGC	TTT	GGT	GGT	AAA	GAA	ACA	AGA	TCA	GCT	TTC	ATT	GCT
	2463				2472			2481			2490			2499			2508		
A	A	A	S	V	P	S	Y	L	L	N	R	P	V	K	L	I	L	D	R
GCG	GCA	GCT	TCT	GTT	CCT	TCC	TAC	CTA	TTG	AAT	CGA	CCT	GTG	AAA	CTC	ATA	CTG	GAC	CGA
	2523				2532			2541			2550			2559			2568		
D	V	D	M	M	I	T	G	H	R	H	S	F	L	G	K	Y	K	V	G
GAT	GTG	GAC	ATG	ATG	ATA	ACT	GGT	CAT	CGT	CAT	AGT	TTT	CTT	GGA	AAG	TAC	AAG	GTT	GGA
	2583				2592			2601			2610			2619			2628		
F	T	N	E	G	K	I	L	A	L	D	L	E	I	Y	N	N	G	G	N
TTT	ACG	AAC	GAA	GGA	AAA	ATA	TTG	GCG	TTG	GAC	CTT	GAA	ATT	TAC	AAC	AAT	GGT	GGC	AAC
	2643				2652			2661			2670			2679			2688		
S	L	D	L	S	L	S	V	L	E	R	A	M	F	H	S	D	N	V	Y
TCT	TTG	GAT	CTC	TCC	CTT	TCT	GTT	CTT	GAA	CGT	GCC	ATG	TTT	CAC	TCG	GAT	AAC	GTT	TAT
	2703				2712			2721			2730			2739			2748		
E	I	P	H	V	R	I	V	G	N	V	C	F	T	N	F	P	S	N	T
GAG	ATC	CCG	CAT	GTA	AGG	ATT	GTT	GGG	AAT	GTT	TGC	TTT	ACT	AAT	TTT	CCT	AGC	AAC	ACT
	2763				2772			2781			2790			2799			2808		
A	F	R	G	F	G	G	P	Q	G	M	L	I	T	E	N	W	I	Q	R
GCT	TTC	CGA	GGG	TTT	GGA	GGC	CCC	CAA	GGT	ATG	CTT	ATA	ACT	GAA	AAC	TGG	ATT	CAA	AGA
	2823				2832			2841			2850			2859			2868		
I	A	A	E	L	N	K	S	P	E	E	I	K	E	M	N	F	Q	V	E
ATC	GCA	GCT	GAG	CTT	AAT	AAA	AGC	CCT	GAA	GAA	ATC	AAA	GAG	ATG	AAC	TTT	CAA	GTG	GAA
	2883				2892			2901			2910			2919			2928		
G	S	V	T	H	Y	C	Q	T	L	Q	H	C	T	L	H	Q	L	W	K
GGA	TCA	GTC	ACC	CAT	TAC	TGT	CAG	ACT	CTT	CAG	CAC	TGC	ACA	TTG	CAT	CAG	CTC	TGG	AAA
	2943				2952			2961			2970			2979			2988		
E	L	K	V	S	C	N	F	L	K	A	R	R	E	A	D	E	F	N	S
GAG	CTG	AAA	GTA	TCG	TGC	AAC	TTC	TTA	AAG	GCC	CGC	AGA	GAA	GCT	GAC	GAA	TTT	AAT	AGT
	3003				3012			3021			3030			3039			3048		
H	N	R	W	K	K	R	G	V	A	M	V	P	T	K	F	G	I	S	F
CAT	AAT	CGG	TGG	AAA	AAG	CGT	GGT	GTA	GCT	ATG	GTT	CCC	ACA	AAA	TTT	GGC	ATA	TCA	TTT
	3063				3072			3081			3090			3099			3108		
T	T	K	F	M	N	Q	A	G	A	L	V	H	V	Y	T	D	G	T	V
ACC	ACA	AAG	TTC	ATG	AAT	CAG	GCC	GGA	GCT	CTT	GTT	CAT	GTT	TAC	ACT	GAC	GGG	ACT	GTT
	3123				3132			3141			3150			3159			3168		
L	V	T	H	G	G	V	E	M	G	Q	G	L	H	T	K	V	A	Q	V
TTA	GTG	ACT	CAT	GGT	GGT	GTG	GAG	ATG	GGT	CAA	GGA	TTG	CAT	ACA	AAG	GTC	GCT	CAA	GTT
	3183				3192			3201			3210			3219			3228		
A	A	S	A	F	N	I	P	L	S	S	V	F	V	S	E	T	S	T	D
GCT	GCA	TCC	GCC	TTT	AAC	ATT	CCA	CTT	AGC	TCA	GTT	TTC	GTG	TCA	GAG	ACA	AGC	ACT	GAC
	3243				3252			3261			3270			3279			3288		

6. ANHANG

```

K   V   P   N   A   S   P   T   A   A   S   A   S   S   D   M   Y   G   A   A
AAG GTT CCT AAT GCG TCA CCA ACT GCT GCT TCT GCG AGC TCT GAT ATG TAT GGT GCT GCA
    3303          3312          3321          3330          3339          3348

V   L   D   A   C   E   Q   I   I   A   R   M   E   P   V   A   S   K   H   N
GTT TTA GAC GCT TGT GAG CAG ATT ATA GCA AGA ATG GAA CCT GTT GCA TCT AAG CAC AAT
    3363          3372          3381          3390          3399          3408

F   N   T   F   T   E   L   V   S   A   C   Y   F   Q   R   I   D   L   S   A
TTC AAC ACA TTT ACT GAG CTA GTA AGT GCC TGC TAC TTT CAA CGG ATA GAC CTA TCA GCT
    3423          3432          3441          3450          3459          3468

H   G   F   H   I   V   P   D   L   G   F   D   W   I   S   G   K   G   N   A
CAT GGT TTT CAC ATA GTT CCT GAT CTT GGG TTT GAC TGG ATA TCT TCT AAA GGG AAC GCC
    3483          3492          3501          3510          3519          3528

F   R   Y   Y   T   Y   G   A   A   F   A   E   V   E   I   D   T   L   T   G
TTT AGA TAT TAC ACA TAT GGA GCT GCC TTT GCG GAA GTT GAG ATA GAT ACA TTG ACT GGT
    3543          3552          3561          3570          3579          3588

D   F   H   T   R   A   A   D   I   M   L   D   L   G   Y   S   L   N   P   A
GAT TTC CAC ACA AGA GCA GCT GAT ATA ATG TTG GAC CTC GGA TAT TCT CTT AAC CCA GCC
    3603          3612          3621          3630          3639          3648

I   D   V   G   Q   I   E   G   A   F   V   Q   G   L   G   W   V   A   L   E
ATT GAT GTT GGA CAA ATA GAA GGA GCG TTT GTA CAA GGA CTG GGT TGG GTA GCT TTA GAA
    3663          3672          3681          3690          3699          3708

E   L   K   W   G   D   A   A   H   K   W   I   K   P   G   S   L   L   T   C
GAA CTC AAA TGG GGA GAT GCA GCT CAT AAA TGG ATT AAA CCA GGA AGT TTA CTC ACT TGC
    3723          3732          3741          3750          3759          3768

G   P   G   N   Y   K   I   P   S   I   N   D   M   P   F   N   L   N   V   S
GGA CCC GGA AAC TAC AAA ATA CCT TCC ATC AAC GAC ATG CCG TTC AAC CTC AAT GTT TCG
    3783          3792          3801          3810          3819          3828

L   L   K   G   N   P   N   T   K   A   I   H   S   S   K   A   V   G   E   P
CTT CTC AAG GGG AAT CCG AAT ACA AAG GCA ATA CAT TCA TCT AAA GCA GTG GGT GAG CCA
    3843          3852          3861          3870          3879          3888

P   F   F   L   A   S   S   V   F   F   A   I   K   E   A   I   K   A   R
CCA TTC TTT CTT GCA TCA TCG GTT TTC TTT GCG ATA AAG GAA GCT ATT AAA GCG GCT AGA
    3903          3912          3921          3930          3939          3948

T   E   V   G   L   T   D   W   F   P   L   E   S   P   A   T   P   E   R   I
ACC GAG GTG GGT CTC ACA GAC TGG TTC CCT CTA GAG AGT CCA GCC ACT CCA GAG CGT ATC
    3963          3972          3981          3990          3999          4008

R   M   A   C   F   D   E   F   S   A   P   F   V   N   S   D   F   Y   P   N
AGG ATG GCT TGT TTC GAC GAA TTT TCA GCT CCT TTT GTA AAT TCA TCA GAT TTC TAC CCT AAT
    4023          4032          4041          4050          4059          4068

L   S   V
CTT AGT GTT TGA T
    4083

```

6.2.2 Sequenz der *AtXDH2*-cDNA (GenBank Accession: AY518202)

Länge der *AtXDH2*-cDNA: 4062 bp; translatiert von 1 bis 4060.

```

M   E   Q   N   E   F   M   E   A   I   M   Y   V   N   G   V   R   R
ATG GAG CAG AAC GAG TTC ATG GAG GCA ATA ATG TAC GTT AAT GGT GTT CGT AGA
    9          18          27          36          45          54

V   L   P   D   G   L   A   H   M   T   L   L   E   Y   L   R   D   L   G   L
GTT TTG CCT GAT GGA TTA GCT CAC ATG ACG CTT CTC GAA TAT CTC AGA GAT TTA GGA TTG
    63          72          81          90          99          108

T   G   T   K   L   G   C   G   E   G   G   C   G   S   C   T   V   M   V   S
ACC GGG ACA AAG CTC GGA TGC GGC GAA GGT GGT TGT GGG TCT TGC ACC GTG ATG GTG TCT
    123          132          141          150          159          168

S   Y   D   R   E   S   K   T   C   V   H   Y   A   V   N   A   C   L   A   P
AGT TAT GAC CGA GAG TCA AAG ACA TGT GTG CAT TAT GCT GTC AAC GCT TGC CTA GCA CCT
    183          192          201          210          219          228

```

6. ANHANG

L	Y	S	V	E	G	M	H	V	I	S	I	E	G	V	G	H	R	K	L
CTC	TAC	TCT	GTA	GAA	GGG	ATG	CAT	GTA	ATA	TCC	ATT	GAA	GGA	GTT	GGT	CAT	CGG	AAA	CTT
		243			252			261			270			279			288		
G	L	H	P	L	Q	E	S	L	A	S	S	H	G	S	Q	C	G	F	C
GGC	TTG	CAC	CCT	CTT	CAG	GAG	TCA	TTG	GCA	TCT	TCG	CAT	GGT	TCT	CAA	TGT	GGG	TTT	TGT
		303			312			321			330			339			348		
T	P	G	F	V	M	S	M	Y	A	L	L	R	S	S	K	N	S	P	S
ACT	CCC	GGT	TTT	GTC	ATG	TCG	ATG	TAT	GCC	TTG	TTG	AGG	TCA	AGT	AAA	AAC	TCA	CCT	TCT
		363			372			381			390			399			408		
E	E	E	I	E	E	C	L	A	G	N	L	C	R	C	T	G	Y	R	P
GAG	GAG	GAG	ATT	GAA	GAA	TGC	CTT	GCA	GGA	AAT	TTG	TGT	CGT	TGT	ACT	GGT	TAT	AGA	CCC
		423			432			441			450			459			468		
I	I	D	A	F	R	V	F	A	K	S	D	D	A	L	Y	S	G	L	S
ATC	ATT	GAT	GCG	TTT	CGG	GTT	TTT	GCA	AAA	TCT	GAT	GAT	GCT	CTA	TAC	AGT	GGT	TTA	TCT
		483			492			501			510			519			528		
S	L	S	L	Q	D	G	S	N	I	C	P	S	T	G	K	P	C	S	C
TCA	CTT	AGC	CTT	CAG	GAC	GGT	TCA	AAT	ATT	TGT	CCA	TCT	ACT	GGC	AAA	CCT	TGT	TCT	TGT
		543			552			561			570			579			588		
G	S	K	T	T	S	E	A	A	T	C	N	E	D	R	F	Q	S	I	S
GGA	TCA	AAA	ACA	ACA	AGT	GAA	GCA	GCT	ACT	TGT	AAT	GAA	GAT	AGA	TTT	CAG	TCA	ATC	TCT
		603			612			621			630			639			648		
Y	S	D	I	D	G	A	K	Y	T	D	K	E	L	I	F	P	P	E	L
TAT	AGT	GAT	ATA	GAT	GGA	GCT	AAG	TAT	ACA	GAT	AAG	GAG	CTT	ATT	TTT	CCC	CCT	GAA	CTT
		663			672			681			690			699			708		
L	L	R	K	L	A	P	L	K	L	G	G	N	E	G	I	T	W	Y	R
CTG	CTG	AGG	AAG	TTA	GCT	CCC	TTA	AAG	TTA	GGG	GGA	AAT	GAG	GGG	ATT	ACC	TGG	TAT	AGA
		723			732			741			750			759			768		
P	V	S	L	Q	N	L	L	E	L	K	A	N	F	P	D	A	K	L	L
CCC	GTA	AGT	CTT	CAG	AAC	TTG	CTT	GAA	CTC	AAA	GCA	AAT	TTT	CCT	GAT	GCA	AAA	CTA	CTG
		783			792			801			810			819			828		
V	G	N	T	E	V	G	I	E	M	R	L	K	R	L	Q	Y	P	V	L
GTT	GGT	AAC	ACG	GAG	GTG	GGA	ATC	GAA	ATG	AGA	CTA	AAG	AGG	TTA	CAG	TAT	CCG	GTG	CTA
		843			852			861			870			879			888		
I	S	A	A	Q	V	P	E	L	N	A	L	N	V	N	D	N	G	I	E
ATC	TCT	GCT	GCT	CAA	GTC	CCA	GAA	CTC	AAC	GCA	TTG	AAT	GTC	AAT	GAC	AAT	GGG	ATA	GAG
		903			912			921			930			939			948		
V	G	S	A	L	R	L	S	E	L	L	R	L	F	R	K	V	V	K	E
GTT	GGT	TCA	GCT	TTG	AGA	CTT	TCT	GAA	CTC	CTG	AGG	TTA	TTC	AGG	AAG	GTA	GTA	AAG	GAG
		963			972			981			990			999			1008		
R	P	A	H	E	T	S	A	C	K	A	F	I	E	Q	L	K	W	F	A
CGT	CCT	GCA	CAT	GAA	ACA	TCA	GCA	TGC	AAG	GCT	TTT	ATC	GAA	CAG	CTG	AAG	TGG	TTT	GCT
		1023			1032			1041			1050			1059			1068		
G	T	Q	I	R	N	V	A	C	I	G	G	N	I	C	T	A	S	P	I
GGG	ACA	CAA	ATA	AGA	AAT	GTT	GCT	TGC	ATT	GGT	GGA	AAC	ATC	TGT	ACA	GCT	AGT	CCA	ATA
		1083			1092			1101			1110			1119			1128		
S	D	L	N	P	L	W	M	A	S	R	A	E	F	R	I	I	N	C	N
TCT	GAT	TTA	AAT	CCT	CTT	TGG	ATG	GCT	TCA	AGA	GCA	GAG	TTT	CGG	ATA	ATC	AAC	TGC	AAT
		1143			1152			1161			1170			1179			1188		
G	D	A	R	S	I	P	A	K	D	F	F	L	G	Y	R	K	V	D	M
GGA	GAT	GCT	AGA	TCT	ATA	CCT	GCA	AAA	GAT	TTC	TTC	CTT	GGC	TAT	CGT	AAA	GTG	GAT	ATG
		1203			1212			1221			1230			1239			1248		
G	S	N	E	I	L	L	S	V	F	L	P	W	T	R	P	L	E	Y	V
GGA	AGC	AAC	GAG	ATC	TTG	TTG	TCG	GTA	TTC	CTT	CCA	TGG	ACA	AGG	CCT	TTA	GAG	TAT	GTG
		1263			1272			1281			1290			1299			1308		
K	E	F	K	Q	A	H	R	R	D	D	D	I	A	I	V	N	G	G	M
AAA	GAA	TTT	AAG	CAG	GCC	CAT	CGC	AGG	GAT	GAT	GAT	ATA	GCT	ATT	GTC	AAT	GGT	GGA	ATG
		1323			1332			1341			1350			1359			1368		

6. ANHANG

R	V	F	L	E	E	K	G	Q	Q	L	F	V	S	D	A	S	I	V	Y
CGT	GTG	TTT	CTT	GAA	GAG	AAA	GGG	CAA	CAA	TTG	TTT	GTT	TCT	GAT	GCA	TCT	ATT	GTT	TAT
		1383			1392			1401			1410			1419			1428		
G	G	V	A	P	L	S	L	R	A	R	N	T	E	E	L	L	I	G	K
GGT	GGT	GTG	GCT	CCT	CTT	TCG	TTG	CGT	GCA	AGA	AAC	ACT	GAG	GAA	CTT	CTA	ATT	GGT	AAG
		1443			1452			1461			1470			1479			1488		
N	W	N	K	C	L	L	Q	D	A	L	K	V	I	Q	S	D	V	L	I
AAT	TGG	AAT	AAA	TGT	CTT	CTG	CAA	GAC	GCA	CTT	AAG	GTC	ATA	CAG	AGT	GAT	GTC	TTG	ATT
		1503			1512			1521			1530			1539			1548		
K	E	G	A	P	G	G	M	V	E	F	R	K	S	L	T	L	S	F	F
AAG	GAA	GGT	GCT	CCT	GGG	GGA	ATG	GTG	GAG	TTT	CGC	AAA	TCT	CTA	ACC	CTA	AGC	TTC	TTC
		1563			1572			1581			1590			1599			1608		
F	K	F	F	L	W	V	T	H	H	V	N	N	V	N	P	T	I	E	T
TTT	AAA	TTT	TTC	TTA	TGG	GTT	ACT	CAT	CAT	GTA	AAT	AAT	GTA	AAT	CCC	ACT	ATA	GAG	ACC
		1623			1632			1641			1650			1659			1668		
F	P	P	S	H	M	S	A	V	Q	L	V	P	R	F	S	R	I	G	K
TTT	CCA	CCC	TCG	CAT	ATG	TCA	GCT	GTG	CAA	CTT	GTT	CCT	CGG	TTC	TCT	AGA	ATT	GGA	AAA
		1683			1692			1701			1710			1719			1728		
Q	D	Y	E	T	V	K	Q	G	T	S	V	G	L	P	E	V	H	L	S
CAA	GAC	TAT	GAG	ACA	GTA	AAA	CAG	GGT	ACA	TCT	GTT	GGC	TTG	CCA	GAG	GTC	CAT	CTT	TCG
		1743			1752			1761			1770			1779			1788		
A	R	M	Q	V	T	G	E	A	E	Y	T	D	D	T	P	L	P	P	C
GCA	AGA	ATG	CAG	GTC	ACA	GGG	GAA	GCA	GAA	TAT	ACT	GAT	GAT	ACC	CCA	TTG	CCG	CCT	TGT
		1803			1812			1821			1830			1839			1848		
T	L	H	A	A	L	V	L	S	K	V	P	H	A	R	I	L	S	V	D
ACC	TTG	CAT	GCT	GCT	TTA	GTG	CTA	AGT	AAA	GTT	CCA	CAT	GCC	CGC	ATC	CTT	TCA	GTT	GAT
		1863			1872			1881			1890			1899			1908		
D	S	A	A	K	S	S	S	G	F	V	G	L	F	L	A	K	D	V	P
GAT	TCG	GCA	GCC	AAA	TCT	TCA	TCT	GGT	TTT	GTT	GGT	CTG	TTT	CTT	GCC	AAA	GAT	GTT	CCC
		1923			1932			1941			1950			1959			1968		
G	N	N	M	I	G	P	I	V	A	D	E	E	L	F	A	T	D	V	V
GGG	AAT	AAT	ATG	ATT	GGA	CCA	ATT	GTT	GCC	GAC	GAA	GAA	TTA	TTT	GCT	ACA	GAC	GTG	GTC
		1983			1992			2001			2010			2019			2028		
T	C	V	G	Q	V	I	G	V	L	V	A	D	T	H	E	N	A	K	T
ACG	TGT	GTG	GGA	CAA	GTC	ATT	GGT	GTG	CTT	GTC	GCG	GAT	ACA	CAT	GAA	AAT	GCA	AAA	ACT
		2043			2052			2061			2070			2079			2088		
A	A	R	K	V	D	V	R	Y	Q	E	L	P	A	I	L	S	I	K	E
GCA	GCA	AGA	AAA	GTT	GAC	GTT	AGG	TAT	CAG	GAA	CTG	CCA	GCA	ATA	TTA	TCA	ATC	AAG	GAG
		2103			2112			2121			2130			2139			2148		
A	I	N	A	K	S	F	H	P	N	T	E	R	R	L	R	K	G	D	V
GCG	ATT	AAT	GCT	AAA	AGT	TTC	CAT	CCG	AAC	ACA	GAG	AGA	AGG	CTT	AGA	AAA	GGG	GAT	GTC
		2163			2172			2181			2190			2199			2208		
E	L	C	F	Q	S	G	Q	C	D	R	I	I	E	G	E	V	Q	M	G
GAG	CTG	TGC	TTT	CAA	TCT	GGT	CAG	TGT	GAC	AGA	ATA	ATA	GAG	GGA	GAG	GTT	CAA	ATG	GGT
		2223			2232			2241			2250			2259			2268		
G	Q	E	H	F	Y	L	E	P	N	G	S	L	V	W	T	I	D	G	G
GGT	CAG	GAA	CAC	TTT	TAC	TTG	GAG	CCT	AAT	GGT	AGT	TTG	GTT	TGG	ACT	ATA	GAT	GGA	GGC
		2283			2292			2301			2310			2319			2328		
N	E	V	H	M	I	S	S	T	Q	A	P	Q	Q	H	Q	K	Y	V	S
AAC	GAA	GTT	CAT	ATG	ATT	TCA	TCC	ACA	CAA	GCT	CCT	CAA	CAG	CAC	CAG	AAA	TAT	GTG	TCT
		2343			2352			2361			2370			2379			2388		
H	V	L	G	L	P	M	S	K	V	V	C	K	T	K	R	L	G	G	G
CAT	GTT	CTT	GGT	CTT	CCA	ATG	TCT	AAA	GTG	GTA	TGC	AAA	ACC	AAA	CGA	CTT	GGT	GGT	GGC
		2403			2412			2421			2430			2439			2448		
F	G	G	K	E	T	R	S	A	F	I	A	A	A	A	S	V	P	S	Y
TTT	GGT	GGT	AAG	GAA	ACA	AGA	TCA	GCT	TTC	ATT	GCT	GCA	GCA	GCT	TCT	GTT	CCT	TCC	TAC
		2463			2472			2481			2490			2499			2508		

6. ANHANG

L	L	N	R	P	V	K	L	I	L	D	R	D	V	D	M	M	I	T	G
CTA	TTG	AAT	CGA	CCC	GTG	AAA	CTC	ATA	CTG	GAC	AGA	GAT	GTG	GAC	ATG	ATG	ATT	ACT	GGT
		2523			2532			2541			2550			2559			2568		
H	R	H	S	F	V	G	K	Y	K	V	G	F	T	N	E	G	K	I	L
CAT	CGC	CAT	AGT	TTC	GTT	GGA	AAG	TAC	AAG	GTT	GGA	TTT	ACG	AAC	GAA	GGG	AAA	ATA	TTG
		2583			2592			2601			2610			2619			2628		
A	L	D	L	E	I	Y	N	N	G	G	N	S	M	D	L	S	L	S	N
GCG	TTG	GAC	CTT	GAA	ATC	TAC	AAC	AAT	GGT	GGA	AAC	TCT	ATG	GAT	CTC	TCT	CTT	TCT	AAT
		2643			2652			2661			2670			2679			2688		
L	E	R	A	M	F	H	S	D	N	V	Y	E	I	P	H	V	R	I	V
CTT	GAA	CGT	GCC	ATG	TTT	CAC	TCG	GAT	AAC	GTT	TAT	GAG	ATC	CCA	CAT	GTG	AGG	ATC	GTT
		2703			2712			2721			2730			2739			2748		
G	N	V	C	F	T	N	F	P	S	N	T	A	F	R	G	F	G	G	P
GGG	AAC	GTT	TGC	TTT	ACT	AAT	TTT	CCC	AGC	AAC	ACC	GCT	TTC	CGA	GGG	TTT	GGA	GGG	CCC
		2763			2772			2781			2790			2799			2808		
Q	G	M	L	I	T	E	N	W	I	Q	R	I	A	A	E	L	D	K	I
CAA	GGT	ATG	CTT	ATA	ACT	GAA	AAT	TGG	ATT	CAG	AGA	ATT	GCA	GCT	GAG	CTG	GAT	AAA	ATC
		2823			2832			2841			2850			2859			2868		
P	E	E	I	K	E	M	N	F	Q	V	E	G	S	I	T	H	Y	F	Q
CCT	GAA	GAA	ATC	AAA	GAG	ATG	AAC	TTT	CAA	GTG	GAA	GGA	TCG	ATC	ACA	CAT	TAC	TTT	CAG
		2883			2892			2901			2910			2919			2928		
S	L	Q	H	C	T	L	H	Q	L	W	K	E	L	K	V	S	S	N	F
TCA	CTT	CAG	CAC	TGC	ACA	TTG	CAC	CAA	CTC	TGG	AAA	GAA	CTG	AAA	GTA	TCC	AGC	AAC	TTC
		2943			2952			2961			2970			2979			2988		
L	K	T	R	R	E	A	D	E	F	N	S	H	N	R	W	K	K	R	G
CTA	AAG	ACT	CGT	AGA	GAA	GCG	GAC	GAG	TTT	AAT	AGT	CAT	AAT	CGG	TGG	AAA	AAG	CGT	GGT
		3003			3012			3021			3030			3039			3048		
V	A	M	V	P	T	K	F	G	I	S	F	T	T	K	F	M	N	Q	A
GTA	GCT	ATG	GTT	CCC	ACA	AAA	TTT	GGC	ATA	TCC	TTT	ACC	ACA	AAG	TTC	ATG	AAT	CAG	GCC
		3063			3072			3081			3090			3099			3108		
G	A	L	V	H	V	Y	T	D	G	T	V	L	V	T	H	G	G	V	E
GGT	GCT	CTT	GTT	CAC	GTT	TAC	ACC	GAT	GGG	ACT	GTT	TTG	GTG	ACA	CAT	GGA	GGT	GTT	GAG
		3123			3132			3141			3150			3159			3168		
M	G	Q	G	L	H	T	K	V	A	Q	V	A	A	T	A	F	N	I	L
ATG	GGC	CAA	GGG	TTG	CAT	ACA	AAG	GTT	GCT	CAA	GTT	GCT	GCA	ACG	GCC	TTT	AAC	ATT	CTC
		3183			3192			3201			3210			3219			3228		
L	S	S	V	F	V	S	E	T	S	T	D	K	V	P	N	A	S	P	T
CTT	AGT	TCG	GTT	TTT	GTG	TCA	GAA	ACA	AGC	ACC	GAC	AAG	GTT	CCT	AAT	GCG	TCA	CCT	ACT
		3243			3252			3261			3270			3279			3288		
A	A	S	A	S	S	D	M	Y	G	A	A	V	L	D	A	C	E	Q	I
GCT	GCT	TCT	GCG	AGT	TCT	GAT	ATG	TAT	GGT	GCT	GCA	GTT	TTA	GAC	GCT	TGT	GAG	CAG	ATT
		3303			3312			3321			3330			3339			3348		
I	A	R	M	E	P	V	A	S	K	H	N	F	N	T	F	S	E	L	A
ATA	GCA	AGA	ATG	GAG	CCT	GTT	GCA	TCT	AAA	CAC	AAT	TTC	AAC	ACA	TTC	TCT	GAG	CTA	GCA
		3363			3372			3381			3390			3399			3408		
S	A	C	Y	F	Q	R	I	D	L	S	A	H	G	F	H	I	V	P	E
AGT	GCC	TGC	TAC	TTT	CAA	CGT	ATA	GAC	CTA	TCA	GCT	CAC	GGT	TTT	CAC	ATT	GTT	CCA	GAA
		3423			3432			3441			3450			3459			3468		
L	E	F	D	W	V	S	G	K	G	N	A	Y	R	Y	Y	T	Y	G	A
CTT	GAA	TTT	GAT	TGG	GTA	TCT	GGA	AAA	GGG	AAC	GCA	TAT	AGA	TAT	TAC	ACA	TAT	GGA	GCT
		3483			3492			3501			3510			3519			3528		
A	F	A	E	V	E	I	D	T	L	T	G	D	F	H	T	R	K	A	D
GCC	TTT	GCT	GAA	GTT	GAG	ATA	GAT	ACA	TTG	ACT	GGT	GAT	TTT	CAC	ACA	AGA	AAA	GCA	GAC
		3543			3552			3561			3570			3579			3588		
I	M	L	D	L	G	Y	S	L	N	P	T	I	D	I	G	Q	I	E	G
ATA	ATG	TTG	GAT	CTC	GGA	TAT	TCT	CTT	AAC	CCA	ACC	ATT	GAT	ATT	GGA	CAA	ATA	GAA	GGA
		3603			3612			3621			3630			3639			3648		

6. ANHANG

A	F	V	Q	G	L	G	W	V	A	L	E	E	L	K	W	G	D	A	A
GCG	TTT	GTA	CAA	GGA	CTA	GGT	TGG	GTA	GCT	CTA	GAA	GAA	CTC	AAG	TGG	GGA	GAT	GCA	GCT
	3663			3672			3681		3690			3699			3708				
H	K	W	I	K	P	G	S	L	L	T	C	G	P	G	S	Y	K	I	P
CAT	AAA	TGG	ATT	AAA	CCA	GGA	AGT	TTA	CTC	ACT	TGC	GGA	CCC	GGA	AGC	TAC	AAA	ATA	CCT
	3723			3732			3741		3750			3759			3768				
S	I	N	D	M	P	F	Q	L	N	V	S	L	L	K	G	N	P	N	A
TCC	ATC	AAC	GAC	ATG	CCG	TTC	CAA	CTG	AAT	GTT	TCT	CTT	CTC	AAG	GGT	AAT	CCA	AAT	GCA
	3783			3792			3801		3810			3819			3828				
K	A	I	H	S	S	K	A	V	G	E	P	P	F	F	L	A	A	S	A
AAG	GCA	ATA	CAT	TCA	TCT	AAA	GCA	GTG	GGT	GAG	CCA	CCG	TTC	TTT	CTT	GCA	GCA	TCA	GCC
	3843			3852			3861		3870			3879			3888				
F	F	A	I	K	E	A	I	K	A	A	R	S	E	V	G	L	T	N	W
TTC	TTT	GCA	ATA	AAG	GAA	GCA	ATC	AAA	GCG	GCT	AGA	AGC	GAG	GTA	GGT	CTC	ACC	AAC	TGG
	3903			3912			3921		3930			3939			3948				
F	P	L	E	T	P	A	T	P	E	R	I	R	M	A	C	F	D	E	F
TTC	CCT	CTG	GAG	ACT	CCA	GCC	ACT	CCA	GAG	CGT	ATC	AGG	ATG	GCT	TGT	TTC	GAC	GAG	TTT
	3963			3972			3981		3990			3999			4008				
S	A	P	F	A	N	S	D	F	C	P	K	L	S	V	.				
TCA	GCT	CCT	TTT	GCA	AAT	TCA	GAT	TTC	TGC	CCA	AAG	CTT	AGT	GTT	TGA				
	4023			4032			4041		4050			4059							

6.2.3 Integrationsort der T-DNA in der AtXDH1-„knock out“-Mutante

Analyse der XDH1 knockout Linie nach *EcoRI*-Verdau und inverser PCR, Klonierung in pGEM-Teasy und Sequenzierung mit SP6-Primer.

XDH1.1700.1	-----	
XDH1genom	GACTGAAGAGTTTCTAATTGGAAAGAATTGGAATAAAGATCTTCTGCAGGATGCGCTTAA	2100
	Integrationsort der linken Grenze der T-DNA ↓	
XDH1.1700.1	-----TTCTGGGGGAATGGTGGAGTTTCG	24
XDH1genom	GGTCATACAGAGCGATGTCGTGATTAAGGAAGATGCTCCTGGGGGAATGGTGGAGTTTCG	2160
	* * * * *	
XDH1.1700.1	GAAATCTCTAACCCTAAGCTTCTTCTTTAAATTTTCTTATGGGTTTCTCATAATGTCAA	84
XDH1genom	GAAATCTCTAACCCTAAGCTTCTTCTTTAAATTTTCTTATGGGTTTCTCATAATGTCAA	2220
	* * * * *	
XDH1.1700.1	TAATGCAAATTCTGCGATAGAGACCTTCCACCCCTCCCATATGTCAGCTGTGCAACCTGT	144
XDH1genom	TAATGCAAATTCTGCGATAGAGACCTTCCACCCCTCCCATATGTCAGCTGTGCAACCTGT	2280
	* * * * *	
XDH1.1700.1	TCCTCGGTTATCTAGAATTGGAAAACAAGACTATGAGACAGTAAAGCAGGGAACATCTGT	204
XDH1genom	TCCTCGGTTATCTAGAATTGGAAAACAAGACTATGAGACAGTAAAGCAGGGAACATCTGT	2340
	* * * * *	
XDH1.1700.1	TGGCTCGTCGGAGGTGCATCTTTAGCGAGAATGCAGGTATGTTGGTCCATTACCCAAA	264
XDH1genom	TGGCTCGTCGGAGGTGCATCTTTAGCGAGAATGCAGGTATGTTGGTCCATTACCCAAA	2400
	* * * * *	
XDH1.1700.1	TTGGTTCTCCACTTTGATTCT-----	285
XDH1genom	TTGGTTCTCCACTTTGATTCTCATTCTGGTTGTTTCTTAGCCACTTCAGGATATAACAT	2460
	* * * * *	

6.2.4 Integrationsort der T-DNA in der AtXDH2-„knock out“-Mutante

Analyse der XDH2 knockout Linie nach *HindIII*-Verdau und inverser PCR, Klonierung in pGEM-Teasy und Sequenzierung mit SP6-Primer.

XDH2genom	GCTTCTTCTTTAAATTTTCTTATGGGTTACTCATCATGTAAATAATGTAAATCCCACTA	1980
XDH2HIII-2	-----A	1
	*	

6. ANHANG

XDH2genom	TAGAGACCTTTCCACCCTCGCATATGTCAGCT-GTGCAACTTGTTCTCGGTTCTCTA-G	2038
XDH2HIII-2	TNGAGACCTTTC-ACCCTGGCATATGTCAGCTTGTGCAACTTGTTCTCGGTTCTCTAAG	60
	* *	
XDH2genom	AATTGGAAAACAAGACTATGAGACAGTAAAACAGGGTACATCTGTTGGCTTGCCAGAGGT	2098
XDH2HIII-2	AATTGGAAAACAAGACTATGAGACAGTAAAACAGGGTACATCTGTTGGGTTGCCAGAGGT	120
	* *	
XDH2genom	CCATCTTTCGGCAAGAATGCAGGTATTTTGGTCCATCTGTTGGCTCGCCGAAGGTCCATA	2158
XDH2HIII-2	CCATCTTTCGGCAAGAA-GCAGGTATTTTGGTCCATCTGTTGGCTCGCCGAAGGTCCATA	179
	* *	
XDH2genom	GAGTGTATCTCAACACTCTTGTATATTCATCTAGGTACAGGGGAAGCAGAATATACTGA	2218
XDH2HIII-2	GAGTGTATCTCAACACTCTTGTATATTCATCTAGGTACAGGGGAAGCAGAATATACTGA	239
	* *	
XDH2genom	TGATACCCCATTGCCGCCTTGTACCTTGCATGCTGCTTTAGTGCTAAGTAAAGTTCC-AC	2277
XDH2HIII-2	TGATACCCCATTGCCGCCTTGTACCTTGCATGCTGCTTTAGTGCTAAGTAAAGTTCCAC	299
	* *	
XDH2genom	ATGCCCGCATCCTTTTCAGTTGATGATTTCGGCAGCCAAATCTTCATCTGGTTTTGTTGGTC	2337
XDH2HIII-2	ATGCCCGCATCCTTTTCAGTTGATGATTTCGGCAGCCAAATCTTCATCTGGTTTTGTTG---	356
	* *	
Integrationsort der linken Grenze der T-DNA ↓		
XDH2genom	TGTTTCTTGCCAAAGATGTTCCCGGGAATAATATGATTGGACCAATTGTTGCCGACGAAG	2397
XDH2HIII-2	-----CCAAAGATGCTTTTGGTG-TATTGTGGT-----	383
	* *	

Zusammenfassung

Die Xanthindehydrogenase (XDH) und die Xanthinoxidase werden als Xanthinoxidoreduktasen zusammengefasst und gehören in die Familie der mononuklearen Molybdo-Enzyme, deren Gemeinsamkeit ein auf Molybdopterin basierender Molybdän-Cofaktor ist. Die XDH ist ubiquitär in allen Organismen verbreitet und in Struktur und Funktion weitgehend konserviert. Die XDH aus Kuhmilch ist eines der am Besten charakterisierten Enzyme überhaupt. Auch in höheren Pflanzen kommt die XDH vor und repräsentiert zusammen mit Aldehydoxidase, Nitratreduktase und Sulfitoxidase die pflanzlichen Vertreter der Molybdo-Enzyme.

Frühere Untersuchungen der pflanzlichen XDH erfolgten am nativ aufgereinigten Enzym, so dass an erster Stelle dieser Arbeit die molekulare Charakterisierung der XDH in *A. thaliana* stand. Während die meisten Organismen nur ein für XDH codierendes Gen aufweisen, besitzt *A. thaliana* die beiden Gene *AtXDH1* und *AtXDH2*, die durch 704 bp voneinander getrennt in Tandem-Orientierung vorliegen. *AtXDH1* und *AtXDH2* sind auf cDNA- wie auf Protein-Ebene zu 93% identisch und zeigen starke Homologien zu XDHs anderer Organismen. Während die *AtXDH2* mRNA konstitutiv exprimiert wird, verändert sich die *AtXDH1* Transkript-Menge nach Applizierung verschiedener Stresse wie Kälte, Trockenheit und Salz, aber auch bei natürlicher Seneszenz und nach Abscisinsäure-Behandlung. Die Veränderungen auf Transkript-Ebene haben nur zum Teil Auswirkungen auf die XDH-Aktivität. Eine Salzbehandlung bewirkt keine Änderungen auf Aktivitäts-Ebene, während Kältestress zu einem Rückgang, Trockenheit und Seneszenz zu einem Anstieg der XDH-Aktivität führen.

Mit dem Ziel der biochemischen Charakterisierung des Proteins wurde die *AtXDH1* in *P. pastoris* rekombinant überexprimiert. Ähnlich den XDHs anderer Organismen ist die *AtXDH1* ein Homodimer mit einer Masse von 300 kDa, dessen Untereinheiten aus jeweils einer [Fe-S]-Zentren-Bindungsdomäne, einer FAD-Bindungsdomäne und einer Moco-Bindungsdomäne bestehen. Die bevorzugten Substrate sind Hypoxanthin und Xanthin, weitere Purine und Aldehyde werden ebenfalls umgesetzt. Allopurinol führt zu einer kompletten Inhibierung des Enzyms. Die aus *P. pastoris* aufgereinigte *AtXDH1* kann in ihrer Aktivität durch eine Behandlung mit der Moco-Sulfurase ABA3 gesteigert werden, die *in vivo* durch Sulfurierung den Aktivitätszustand der XDH reguliert. Es wurde gezeigt, dass die *AtXDH1* im Gegensatz zu den XDHs aus Säugetieren nicht in eine Oxidase überführt werden kann, bei einer Restaktivität mit molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor jedoch Superoxidradikale produziert. Im Zusammenhang mit den beobachteten Transkript-Veränderungen bei natürlicher Seneszenz und anderen Stressen kann daraus gefolgert werden, dass der pflanzlichen XDH neben der Purindegradation eine Bedeutung in Prozessen zukommt, die die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies erfordern.